

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 236**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010 E 10714548 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2421898**

54 Título: **Anticuerpos específicos para cadherina-17**

30 Prioridad:

20.04.2009 US 170980 P

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

16.06.2016

73 Titular/es:

**OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD (100.0%)
94A Innovation Drive, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire OX14 4RZ, GB**

72 Inventor/es:

**ROHLFF, CHRISTIAN y
TERRETT, JONATHAN, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 574 236 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

Anticuerpos específicos para cadherina-17

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona generalmente con los campos de la inmunología y la biología molecular. De manera más específica, se proporcionan en la presente anticuerpos, y otras proteínas terapéuticas dirigidas contra la molécula de adhesión celular Cadherina-17, ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos y proteínas terapéuticas, métodos para preparar los anticuerpos monoclonales inventivos y otras proteínas terapéuticas, y métodos para el tratamiento de enfermedades, tales como cánceres mediados por la expresión/actividad de Cadherina-17 y/o asociados con la expresión/actividad anormal de los ligandos de la misma.

10 Antecedentes de la invención

15 Las cadherinas son moléculas de adhesión celular dependientes de calcio. De preferencia interactúan con sí mismas de una manera homofílica para conectar células; las cadherinas por lo tanto pueden contribuir a la clasificación de los tipos heterogéneos de células. La molécula de cadherina Cadherina-17 también es conocida como cadherina de hígado-intestino o transportador HPT-1 asociado a péptido. La Cadherina-17 puede tener una función en la organización morfológica del hígado e intestino. La estructura de la Cadherina-17 se caracteriza por tener un dominio extracelular con 7 dominios de cadherina, un solo dominio de transmembrana hidrofóbico y un extremo corto citoplásmico en el C terminal. Sólo se conoce una isoforma de Cadherina-17, No de Acceso de Genbank NM_004063. La Cadherina-17 tiene el número de acceso Q12864 en las bases de datos Swiss-PROT y trEMBL (mantenidas por el Instituto Sueco de Bioinformática (SIB) y el Instituto de Bioinformática Europeo (EBI) disponibles en www.expasy.com). El ortólogo de Cadherina-17 de ratón (Q9R100) muestra 76% de identidad con la Cadherina-17 humana.

25 De acuerdo con SWISS-PROT, la Cadherina-17 se expresa en el tracto gastrointestinal y el ducto pancreático. No se detecta en el riñón, pulmón, hígado, cerebro, glándula adrenal o la piel. La expresión de la Cadherina-17 ha sido reportada en el cáncer gástrico (véase, por ejemplo, Ito *et al.*, *Virchows Arch.* 2005 Oct; 447(4):717-22; Su *et al.*, *Mod Pathol.* 2008 Nov;21(11):1379-86; Ko *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 25;319(2):562-8; y Dong *et al.*, *Dig Dis Sci.* 2007 Feb;52(2):536-42), cáncer pancreático y cáncer colorrectal (Su *et al.*, *Mod Pathol.* 2008 Nov;21(11):1379-86) y carcinoma hepatocelular (Wong *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Nov 21;311(3):618-24). La Solicitud de Patente Internacional WO2008/026008 describe a la Cadherina-17 como un marcador para el cáncer colorrectal y como una diana biológica para anticuerpos terapéuticos y otros agentes farmacéuticos.

30 Takamura *et al.*, (2003) *Cancer Sci.*, Vol. 94, p. 425-430, describe la expresión de cadherina hígado-intestino y su posible interacción con galectina-3 en adenocarcinoma ductal del páncreas. Los anticuerpos monoclonales contra cadherina-17 se han descrito previamente (véase el catálogo de R&D Systems 22 de Septiembre de 2004 [XP002591715]).

35 Resumen de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos dirigidos contra la Cadherina-17, ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos y proteínas terapéuticas, métodos para preparar anticuerpos monoclonales anti- Cadherina-17 y otras proteínas terapéuticas, y métodos para el tratamiento de enfermedades, tales como trastornos mediados por Cadherina-17, por ejemplo, cánceres humanos, incluyendo cáncer colorrectal.

40 Así, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos, humanizados y completamente humanos, que se unen a la Cadherina-17 y que exhiben una o más propiedades funcionales deseables. Tales propiedades incluyen, por ejemplo, unión específica con alta afinidad a la Cadherina-17 humana. También se proporcionan métodos para tratar una variedad de enfermedades mediadas por la Cadherina-17 utilizando los anticuerpos, proteínas y composiciones de la presente invención.

45 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-cadherina-17 aislado

que comprende:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 4;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 8;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 17;

5 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 24;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 30; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 34,

10 opcionalmente en donde cualquiera de las SEQ ID NOs: 4, 8, 17, 24, 30 o 34 comprende independientemente de uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones conservadoras de los aminoácidos, en donde el anticuerpo es capaz de ser internalizado en una célula que expresa Cadherina-17.

15 La presente divulgación describe un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción que se une al antígeno del mismo, un fragmento de anticuerpo, o un mimético de anticuerpo que se une a un epítipo de la Cadherina-17 humana, reconocido por un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 38, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 y 46 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 49, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 y 58. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de una sola cadena, un inmunoconjugado, un anticuerpo defucosilado, y un anticuerpo biespecífico. El fragmento de anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste de: un UniCuerpo (UniBody), un anticuerpo de dominio y un Nanocuerpo (Nanobody). En algunas realizaciones, los inmunoconjugados de la invención comprenden un agente terapéutico. En otro aspecto de la invención, el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radioactivo.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de: un Afficuerpo (Affybody), una DARPin, una Anticalina, un Avímero, un Versacuerpo (Versabody) y una Duocalina.

En las realizaciones alternas, las composiciones de la presente invención comprenden un anticuerpo aislado o una porción que se une al antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 En otros aspectos, el anticuerpo de la presente invención es una composición que comprende el anticuerpo aislado o una porción que se une al antígeno del mismo, de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En algunas **realizaciones**, la invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo aislado o la porción que se une al antígeno, que se une a un epítipo de la Cadherina-17 humana. Otros aspectos de la invención comprenden vectores de expresión que comprenden tales moléculas de ácido nucleico, y células hospederas que comprenden tales vectores de expresión.

40 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-Cadherina-17, el método comprende los pasos de: obtener una célula hospedera que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la invención; cultivar la célula hospedera en un cultivo de la célula hospedera; proporcionar las condiciones de cultivo de la célula hospedera, en donde se expresan una o más moléculas de ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo de la célula hospedera o del cultivo de la célula hospedera.

Se describen aquí métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con las células objetivo que expresan la

5 Cadherina-17, el método comprende el paso de administrar a un sujeto un anticuerpo anti-Cadherina-17, o una porción que se une al antígeno del mismo, en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la enfermedad. En algunos ejemplos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos o la porción que se une al antígeno de los mismos es cáncer humano. En algunos ejemplos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos es cáncer colorrectal.

10 En otras realizaciones, la invención está dirigida a un anticuerpo anti-Cadherina-17, o una porción que se une al antígeno del mismo, para utilizarse en el tratamiento o prevención de un cáncer asociado con las células objetivo que expresan a Cadherina-17. En algunos ejemplos, la enfermedad tratada o prevenida por el anticuerpo o porción que se une al antígeno del mismo, es un cáncer humano. En algunos ejemplos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos de la presente invención es cáncer colorrectal.

15 En otras realizaciones, la invención está dirigida al uso de un anticuerpo anti-cadherina-17, o porción que se une al antígeno del mismo, para la fabricación de un medicamento para utilizarse en el tratamiento o prevención de un **cáncer** asociado con células objetivo que expresan a Cadherina-17. En algunos aspectos, la enfermedad tratada o prevenida por el medicamento de la invención, es un cáncer humano. En algunas realizaciones, la enfermedad tratada o prevenida por el medicamento de la invención es cáncer colorrectal.

20 También se describe un anticuerpo monoclonal aislado o una porción que se une al antígeno del mismo, un fragmento de anticuerpo, o un mimético de anticuerpo que se une a un epítipo en la Cadherina-17 humana, reconocido por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, seleccionadas del grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 35 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 47; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 36 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 48; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 37 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 48; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 38 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 49; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 39 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 50; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 40 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 51; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 40 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 54; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 40 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 55; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 41 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 52; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 42 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 53; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 43 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 56; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 44 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 55; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 45 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 57; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 46 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 58.

45 En ejemplos adicionales, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de una sola cadena, un inmunoconjugado, un anticuerpo defucosilado, y un anticuerpo biespecífico. En ejemplos adicionales, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: un UniCuerpo (UniBody), un anticuerpo de dominio, y un Nanocuerpo (Nanobody). En algunos ejemplos, el mimético de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: un Afficuerpo (Affybody), una DARPIn, una Anticalina, un Avímero, un Versacuerpo (Versabody) y una Duocalina. En ejemplos

50 adicionales, la composición comprende el anticuerpo aislado o porción que se une al antígeno del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la presente invención es una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica la cadena

pesada o ligera del anticuerpo aislado o la porción que se une al antígeno del mismo del anticuerpo de la invención, y en los aspectos adicionales, puede incluir un vector de expresión que comprende tales ácidos nucleicos, y células hospederas que comprenden tales vectores de expresión.

5 Otra realización de la presente invención es un hibridoma que expresa el anticuerpo o porción que se une al antígeno del mismo de cualquiera de los anticuerpos de la invención.

Otros aspectos de la invención están dirigidos a métodos para hacer los anticuerpos de la invención, que comprenden los pasos de:

inmunizar a un animal transgénico con un péptido de Cadherina-17;

recuperar el ARNm de los linfocitos B de dicho animal;

10 convertir dicho ARNm a ADNc;

expresar dicho ADNc en fagos de manera que los anticuerpos anti-Cadherina-17 codificados por dicho ADNc se presenten en la superficie de dichos fagos;

seleccionar fagos que presenten anticuerpos anti-Cadherina-17;

15 recuperar las moléculas de ácido nucleico de dichos fagos seleccionados que codifican dichas inmunoglobulinas de Cadherina-17;

expresar dichas moléculas de ácido nucleico recuperado en una célula hospedera; y

recuperar anticuerpos de dicha célula hospedera que se une a la Cadherina-17.

20 **También se describe aquí** un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción que se une al antígeno del mismo, se une a un epítipo en el polipéptido de Cadherina-17, que tiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 136 o 137 reconocidas por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 38, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, o 46, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 49, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, o 58.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 59) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 35) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A1. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 5) y CDR3 (SEQ ID NO: 14), están delineadas.

30 La Figura 2 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 60) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 36) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A2. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 6) y CDR3 (SEQ ID NO: 15) están delineadas.

La Figura 3 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 61) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 7) y CDR3 (SEQ ID NO: 16) están delineadas.

35 La Figura 4 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 62) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 38) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A4. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 8) y CDR3 (SEQ ID NO: 17) están delineadas.

La Figura 5 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 63) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A5. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 7) y CDR3 (SEQ ID NO: 18) están delineadas.

- La Figura 6 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 64) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A6, PTA001_A9 y PTA001_A10. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 7) y CDR3 (SEQ ID NO: 16) están delineadas.
- 5 La Figura 7 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 65) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 41) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 9) y CDR3 (SEQ ID NO: 19) están delineadas.
- La Figura 8 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 66) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 42) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A8. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 7) y CDR3 (SEQ ID NO: 16) están delineadas.
- 10 La Figura 9 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 67) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 43) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A11. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 10) y CDR3 (SEQ ID NO: 20) están delineadas.
- La Figura 10 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 68) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 44) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A12. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3),
- 15 CDR2 (SEQ ID NO: 11) y CDR3 (SEQ ID NO: 21) están delineadas.
- La Figura 11 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 69) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 45) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A13. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 12) y CDR3 (SEQ ID NO: 18) están delineadas.
- La Figura 12 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 70) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 46) de
- 20 la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal PTA001_A14. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 13) y CDR3 (SEQ ID NO: 15) están delineadas.
- La Figura 13 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 71) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 47) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A1. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 28) y CDR3 (SEQ ID NO: 32) están delineadas.
- 25 La Figura 14 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 72) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 48) de la región variable de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales PTA001_A2 y PTA001_A3. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.
- La Figura 15 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 73) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 49) de
- 30 la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A4. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 30) y CDR3 (SEQ ID NO: 34) están delineadas.
- La Figura 16 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 74) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 50) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A5. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 31) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.
- La Figura 17 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 75) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 51) de
- 35 la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A6. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.
- La Figura 18 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 76) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 52) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 26), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.
- 40 La Figura 19 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 77) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 53) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A8. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 31) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.

La Figura 20 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 78) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 54) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A9. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.

5 La Figura 21 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 79 y 81) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 55) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A10 y PTA001_A12. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.

La Figura 22 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 80) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 56) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A11. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 27), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.

10 La Figura 23 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 82) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 57) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A13. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 31) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.

15 La Figura 24 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 83) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 58) de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal PTA001_A14. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 29) y CDR3 (SEQ ID NO: 33) están delineadas.

20 La Figura 25 muestra la alineación de las secuencias de nucleótidos de la región CDR1 de cadena pesada de PTA001_A1 (SEQ ID NO:84) con los nucleótidos 240-269 de la secuencia de nucleótidos V_H 7-39 de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 125) y las alineaciones de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR1 de cadena pesada de PTA001_A2 y PTA001_A14 (SEQ ID NO: 85); PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13, (SEQ ID NO:86); y PTA001_A4 (SEQ ID NO:87) con los nucleótidos 67-96 de la secuencia de nucleótidos H17 del gen II de la línea germinal V_H de ratón (SEQ ID NO: 126).

25 La Figura 26 muestra las alineaciones de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR2 de cadena pesada de PTA001_A2 (SEQ ID NO:89); PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A8, PTA001_A9 y PTA001_A10 (SEQ ID NO:90); PTA001_A4 (SEQ ID NO:91); PTA001_A7 (SEQ ID NO:92); PTA001_A11 (SEQ ID NO:93); PTA001_A12 (SEQ ID NO:94); PTA001_A13 (SEQ ID NO:95) y PTA001_A14 (SEQ ID NO:96) con los nucleótidos 1096-1146 de la secuencia de nucleótidos VH105 de la región II de la línea germinal V_H de ratón (SEQ ID NO: 127).

30 La Figura 27 muestra la alineación de la secuencia de nucleótidos de la región CDR1 de cadena ligera de PTA001_A1 (SEQ ID NO:105); con los nucleótidos 1738-1785 de la secuencia de nucleótidos 1-110 de la línea germinal V_K de ratón (SEQ ID NO:128), la alineación de la secuencia de nucleótidos de la región CDR1 de cadena ligera de PTA001_A4 (SEQ ID NO:107) con los nucleótidos 510-560 de la secuencia de nucleótidos 8-30 de la línea germinal V_K de ratón (SEQ ID NO:130), y las alineaciones de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR1 de cadena ligera de PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9 y PTA001_A14 (SEQ ID NO:106); PTA001_A5 y PTA001_A13 (SEQ ID NO:108); PTA001_A7 (SEQ ID NO:109); PTA001_A8 (SEQ ID NO:110); PTA001_A10 (SEQ ID NO:111); PTA001_A11 (SEQ ID NO:112); y PTA001_A12 (SEQ ID NO:113) con los nucleótidos 1807-1854 de la secuencia de nucleótidos 24-140 de la línea germinal V_K de ratón (SEQ ID NO: 133).

35 La Figura 28 muestra la alineación de la secuencia de nucleótidos de la región CDR2 de cadena ligera de PTA001_A4 (SEQ ID NO:116); con los nucleótidos 606-626 de la secuencia de nucleótidos 8-30 de la línea germinal V_K de ratón (SEQ ID NO:131), y las alineaciones de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR2 de cadena ligera de PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9 y PTA001_A14 (SEQ ID NO:115); PTA001_A5 y PTA001_A13 (SEQ ID NO:117); PTA001_A7, PTA001_A10, PTA001_A11 y PTA001_A12 (SEQ ID NO:118); y PTA001_A8 (SEQ ID NO:119) con los nucleótidos 1900-1920 de la secuencia de nucleótidos 24-140 de la línea germinal V_K de ratón (SEQ ID NO: 134).

40 La Figura 29 muestra la alineación de la secuencia de nucleótidos de la región CDR3 de cadena ligera de PTA001_A1 (SEQ ID NO:120); con los nucleótidos 1948-1971 de la secuencia de nucleótidos 1-110 de la línea germinal V_K de ratón (SEQ ID NO:129), la alineación de la secuencia de nucleótidos de la región CDR3 de cadena ligera de PTA001_A4 (SEQ ID NO:122) con los nucleótidos 723-749 de la secuencia de nucleótidos 8-30 de la línea

- 5 germinal V_K de ratón (SEQ ID NO:132), y las alineaciones de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR3 de cadena ligera de PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12 y PTA001_A14 (SEQ ID NO:121); PTA001_A5, PTA001_A8 y PTA001_A13 (SEQ ID NO:123); y PTA001_A7 (SEQ ID NO:124); con los nucleótidos 2017-2043 de la secuencia de nucleótidos 24-140 de la línea germinal V_K de ratón (SEQ ID NO: 135).
- La Figura 30 muestra el análisis de transferencia Western de la Cadherina-17 usando el anticuerpo monoclonal PTA001_A4.
- La Figura 31 muestra los resultados del análisis FACS en PTA001_A4 y células LoVo.
- La Figura 32 muestra los resultados del análisis FACS en PTA001_A4 en LoVo y células LS174T.
- 10 La Figura 33A muestra la unión superficial del complejo PTA001_A4/conjugado de FITC de anticuerpo secundario a células LoVo después de 60 minutos de incubación.
- La Figura 33B muestra la internalización del complejo PTA001_A4/conjugado de FITC de anticuerpo secundario después de 120 minutos de incubación con células LoVo.
- 15 La Figura 34A muestra los resultados de la internalización de PTA001_A4 por ensayo MabZAP en células LoVo de cáncer de colon.
- La Figura 34B muestra los resultados de la internalización de PTA001_A4 por ensayo MabZAP en células LoVo de cáncer de colon.
- La Figura 34C muestra los resultados de la internalización de PTA001_A4 por ensayo MabZAP en células LS174T de cáncer de colon.
- 20 La Figura 34D muestra los resultados de la internalización de PTA001_A4 por ensayo MabZAP en células LS174T de cáncer de colon.
- La Figura 35A muestra los resultados de la internalización de PTA001_A4 por ensayo MabZAP en células LoVo de cáncer de colon.
- 25 La Figura 35B muestra los resultados de la internalización de PTA001_A4 por ensayo MabZAP en células LS174T de cáncer de colon.
- Descripción detallada de la invención
- La presente invención se relaciona con anticuerpos aislados, incluyendo, pero no limitado a anticuerpos monoclonales, por ejemplo, que se unen de manera específica a la Cadherina-17 con alta afinidad. Los anticuerpos de la invención comprenden las características estructurales particulares tales como regiones CDR, que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La invención proporciona anticuerpos aislados, anticuerpos defucosilados, inmunoconjugados, moléculas biespecíficas, afficuerpos (affybodies), anticuerpos de dominio, nanocuerpos (nanobodies) y unicuerpos (unibodies), métodos para hacer tales moléculas, y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas y un portador farmacéutico. La invención también se relaciona con métodos para utilizar las moléculas, tales como para detectar la Cadherina-17, así como para tratar enfermedades asociadas con la expresión de Cadherina-17, tal como Cadherina-17 expresada en tumores, incluyendo aquellos tumores de cáncer colorrectal.
- 30
- 35
- Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen primero. Las definiciones adicionales se exponen a través de la descripción detallada.
- 40 Los términos "Cadherina-17", "cadherina de hígado-intestino", "LI-cadherina", "HPT-1 transportado asociado con péptido intestinal" y "CDH17" se usan de manera intercambiable. La Cadherina-17 también ha sido identificada como OGTA001 en la Solicitud de Patente Internacional WO2008/026008. Los anticuerpos humanos de esta divulgación

pueden, en ciertos casos, reaccionar de manera cruzada con la Cadherina-17 de especies diferentes a la humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más Cadherina-17 humana y puede no exhibir reactividad cruzada de especies o de otros tipos no humanos. La secuencia de aminoácidos completa para una Cadherina-17 humana de ejemplo tiene el número de acceso de Genbank NM_004063.

El término “respuesta inmune” se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células que presentan el antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complementos), que resultan en un daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de los patógenos invasores, células o tejidos infectados con los patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una “trayectoria de transducción de la señal”, se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de la señal que juegan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. Como se utiliza en la presente, la expresión “receptor de la superficie celular” incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de tal señal a través de la membrana del plasma de una célula. Un ejemplo de un “receptor de la superficie celular” de la presente invención, es el receptor de Cadherina-17.

El término “anticuerpo” referido en la presente, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento que se une al antígeno (es decir, “porción que se une al antígeno”) o cadenas sencillas del mismo. Un “anticuerpo” se refiere a una glucoproteína que puede comprender al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción que se une al antígeno del mismo. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L o V_K) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L / V_K pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones que determinan la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L/V_K está compuesta de tres CDR y cuatro FR, colocados del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores hospederos, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

La definición de “anticuerpo” incluye, pero no se limita a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos biespecíficos, minocuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados en la presente como “anticuerpos miméticos”), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominados como “conjugados de anticuerpos”), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de un anticuerpo específico incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo anticuerpo, (iv) el fragmento dAb que consiste de un solo dominio variable; (v) regiones de CDR aisladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están ligados por un enlazador peptídico que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión de antígeno, (viii) dímeros Fv de cadena simple biespecíficos, y (ix) “diacuerpos” o “triacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión de genes. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden ser estabilizadas mediante la incorporación de puentes bisulfuro que enlazan los dominios VH y VL. Ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpos se describen en Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-357 y las referencias citadas en ellos.

En una realización, un anticuerpo descrito en la presente puede ser un anticuerpo multiespecífico, y de manera

- notable un anticuerpo biespecífico, algunas veces denominado como “diacuerpos”. Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) diferentes antígenos. Los diacuerpos pueden fabricarse en una variedad de maneras conocidas en la técnica, por ejemplo, prepararse químicamente o de hibridomas híbridos. En una realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpo minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. En algunos casos, el scFv puede unirse a la región Fc, y puede incluir algunos o todas de las regiones de sujeción. Para una descripción de anticuerpos multiespecíficos véase Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 y las referencias citadas en las mismas.
- Por “CDR” como se usa en la presente se entiende una Región Determinante de Complementariedad de un dominio variable de anticuerpo. La identificación sistemática de los residuos incluidos en los CDR han sido desarrollados por Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda) y alternativamente por Chothia (Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883; Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273: 927-948). Para los fines de la presente invención, los CDR se definen como un conjunto de residuos ligeramente más pequeños que los CDR definidos por Chothia. Los VL CDR están definidos en la presente para incluir los residuos en las posiciones 27-32 (CDR1), 50-56 (CDR2), y 91-97 (CDR3), en donde la numeración es de acuerdo con Chothia. Ya que los VL CDR como se definen por Chothia y Kabat son idénticos, la numeración de estas posiciones VL CDR también es de acuerdo a Kabat. Los VH CDR están definidos en la presente para incluir residuos en las posiciones 27-33 (CDR1), 52-56 (CDR2), y 95-102 (CDR3), en donde la numeración es de acuerdo a Chothia. Estas posiciones VH CDR corresponden a las posiciones de Kabat 27-35 (CDR1), 52-56 (CDR2), y 95-102 (CDR3).
- Como será apreciado por los expertos en la técnica, los CDR descritos en la presente también incluyen variantes, por ejemplo cuando los CDR descritos en la presente se retromutan en diferentes regiones de marco. En general, la identidad del aminoácido entre CDR variantes individuales es de al menos 80% a las secuencias descritas en la presente, y más típicamente con identidades que preferiblemente aumentan de al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y casi 100%. De una manera similar, el “por ciento (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico” con respecto a la secuencia del ácido nucleico de las proteínas de unión identificadas en la presente es definido como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos en la secuencia codificadora de la proteína de unión a antígeno. Un método específico utiliza el modulo BLASTN del conjunto WU-BLAST-2 en los parámetros preestablecidos, con alcance superpuesto y fracción superpuesta ajustados a 1 y 0.125, respectivamente.
- En general, la identidad de la secuencia de ácido nucleico entre las secuencias de nucleótidos que codifican CDR variantes individuales y las secuencias de nucleótidos descritas en la presente son de al menos 80%, y más típicamente con identidades que preferiblemente aumentan de al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, y casi 100%.
- Por lo tanto, un “CDR variante” es uno con la homología especificada, similitud, o identidad al CDR madre de la invención, y comparte la función biológica, incluyendo, pero no limitado a, al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la especificidad y/o actividad del CDR madre.
- Aunque el sitio o región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la mutación *per se* no requiere ser predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el desempeño de una mutación en un sitio dado, puede conducirse una mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo y las variantes de CDR de proteína que se une al antígeno expresado examinarse para la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, la mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis por PCR. El examen de los mutantes se realiza usando ensayos de actividades de proteína que se une a antígeno como se describe en la presente.
- Las sustituciones de aminoácidos son típicamente para residuos simples; las inserciones usualmente estarán en el orden de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente mayores. Las deleciones varían de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque en algunos casos las deleciones pueden ser mucho mayores.

Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de estos pueden usarse para llegar a un derivado o variante final. En general estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y especificidad de la proteína que se une al antígeno. Sin embargo, pueden ser tolerados mayores cambios en ciertas circunstancias.

5 Por “Fab” o “región Fab” como se usa en la presente se entiende el polipéptido que comprende los dominios VH, CH1, VL, y CL inmunoglobulina. El Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión a Fab, o cualquier otra realización de anticuerpos como se define en la presente.

10 Por “Fv” o “fragmento Fv” o “región Fv” como se usa en la presente se entiende un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un solo anticuerpo.

Por “marco” como se usa en la presente se entiende la región de un dominio variable de anticuerpo exclusivo de esas regiones definidas como CDR. Cada marco de dominio variable de anticuerpo puede ser subdividido además en regiones contiguas separadas por los CDR (FR1, FR2, FR3 y FR4).

15 El término “porción que se une a un antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”), como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, Cadherina-17). Ha sido demostrado que la función de unión un antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de union comprendidos dentro del término “porción que se une a un antígeno” de un anticuerpo incluyen
 20 (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL / VK, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente bisulfuro a la región de sujeción; (iii) un fragmento Fab', que es en esencia un Fab con parte de la región de sujeción (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (v) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste de un dominio VH; (vii) una región determinante complementaria aislada (CDR); y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un dominio de una variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL / VK y VH, son codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permita formar una cadena de una sola proteína en la cual las regiones VL / VK y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocido como una cadena simple Fv (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos de una sola cadena también estén comprendidos dentro del término “porción que se une a un antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo son obtenidos usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos son examinados por su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

35 Un “anticuerpo aislado,” como se utiliza en la presente, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une de manera específica a Cadherina-17 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen de manera específica a antígenos diferentes a Cadherina-17). Un anticuerpo aislado que se une de manera específica a Cadherina-17 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada para otros antígenos, tales como moléculas de Cadherina-17 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o compuestos químicos en una forma no encontrada naturalmente.

45 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son proteínas recombinantes, proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína “aislada” no está acompañada por al menos parte del material con el cual normalmente está asociada en su estado natural, por ejemplo constituida al menos de aproximadamente 5%, o al menos aproximadamente 50% por peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir de 5 a 99.9% por peso del contenido total de la proteína dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína puede estar a una concentración significativamente mayor a través del uso de un promotor inducible o un promotor de alta expresión, de manera que la proteína se forma a niveles aumentados de concentración. En el caso de proteínas recombinantes, la definición incluye la producción de un anticuerpo en una
 50 amplia variedad de organismos y/o células hospederas que son conocidas en la técnica en la cual no se producen

de manera natural.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” como se utilizan en la presente, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad y afinidad de unión por un epítipo particular.

- 5 Como se utiliza en la presente, “isotipo”, se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificada por los genes de la región constante de cadena pesada.

Las expresiones “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno”, se utilizan de manera indistinta en la presente con el término “un anticuerpo que se une de manera específica a un antígeno”.

- 10 El término “derivados de anticuerpo”, se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo u otro agente o anticuerpo. Por ejemplo, anticuerpos de la presente invención pueden ser conjugados con una toxina, una marca, etc. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser no humanos, quimérico, humanizados, o completamente humanos. Para una descripción de los conceptos de anticuerpos quiméricos y humanizados véase Clark et al., 2000 y las referencias citadas en ella (Clark, 2000, *Immunol Today* 21:397-402). Los anticuerpos quiméricos comprenden la región variable de un anticuerpo no humano, por ejemplo
- 15 los dominios VH y VL de origen de ratón o rata, ligados operativamente a la región constante de un anticuerpo humano (véase por ejemplo la Patente de E.U.A No. 4,816,567). En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención son humanizados. Por anticuerpos “humanizados” como se usa en la presente se entiende un anticuerpo que comprende una región humana de marco (FR) y una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano (usualmente de rató o rata). El anticuerpo no humano que proporciona los CDR es llamado el “donador” y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco es llamada el “aceptor”. La humanización se basa principalmente en el injerto de los CDR del donador sobre el aceptor (humano) marco VL y VH (Patente de E.U.A. No. 5,225,539). Esta estrategia es referida como “injerto de CDR”. A menudo se requiere “la retromutación” de los residuos del marco del aceptor seleccionado a los residuos correspondientes del donador correspondiente para ganar de Nuevo afinidad que es perdida en la construcción injertada injicial (US 5,530,101; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 6,180,370; US 5,859,205; US 5,821,337; US 6,054,297; US 6,407,213). El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente esa de una inmunoglobulina humana, y entonces típicamente comprenderá una región Fc humana. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica, y pueden ser esencialmente realizados siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536). Ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales de murino humanizados son también conocidos en la técnica, por ejemplo los anticuerpos que se unen a la proteína C humana (O'Connor et al., 1998, *Proteína Eng* 11:321-8), receptor de interleucina 2 (Queen et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci*, USA 86:10029-33), y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Carter et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-9). En una
- 20 realización alterna, los anticuerpos de la presente invención pueden ser completamente humanos, es decir que las secuencias de los anticuerpos son completamente o sustancialmente humanas. Un número de métodos son conocidos en la técnica para generar anticuerpos completamente humanos, incluyendo el uso de ratones transgénicos (Bruggemann et al., 1997, *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos acoplados con métodos de selección (Griffiths et al., 1998, *Curr Opin Biotechnol* 9:102-108).
- 25
- 30
- 35

- 40 El término “anticuerpo humanizado” pretende referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como ratón, se han injertado en las secuencias de marco humanas. Las modificaciones adicionales de la región de marco pueden hacerse dentro de las secuencias de marco humanas.

- 45 El término “anticuerpo quimérico” pretende referirse a anticuerpos en los cuales las secuencias de la región variable se derivan de una especie, y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tales como un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término “se une de manera específica o (se une inmunoespecíficamente” no pretende indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a su objetivo pretendido. Más bien, un anticuerpo “se une específicamente” si su afinidad por

su objetivo pretendido es aproximadamente 5 veces mayor cuando se compara con su afinidad por una molécula no objetivo. Convenientemente no existe una reacción cruzada o unión cruzada con sustancias indeseadas, especialmente proteínas o tejidos que existen naturalmente de una persona o animal saludable. La afinidad del anticuerpo será, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, tal como 10 veces, tal como 25 veces, especialmente 50 veces, y particularmente 100 veces o más, mayor para una molécula objetivo que su afinidad para una molécula no objetivo. En algunas realizaciones, la unión específica entre un anticuerpo u otro agente de unión y un antígeno significa una afinidad de unión de al menos 10^6 M^{-1} . Los anticuerpos pueden, por ejemplo, unirse con afinidades de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , tal como entre aproximadamente 10^8 M^{-1} a aproximadamente 10^9 M^{-1} , aproximadamente 10^9 M^{-1} a aproximadamente 10^{10} M^{-1} , o aproximadamente 10^{10} M^{-1} a aproximadamente 10^{11} M^{-1} . Los anticuerpos pueden, por ejemplo, unirse con un EC_{50} de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferiblemente 10 pM o menos.

El término “no se une sustancialmente” a una proteína o células, como se utiliza en la presente, significa que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o células, es decir, se une a la proteína o células con una K_D de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o más, de manera más preferida $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ o más, de manera más preferida $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ o más, de manera más preferida $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ o más, aún de manera más preferida $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ o más.

El término “ EC_{50} ” como se utiliza en la presente, pretende referirse a la potencia de un compuesto cuantificando la concentración que conduce a una respuesta/efecto máximo al 50%. El EC_{50} puede ser determinado por Scratchard o FACS.

El término “ K_{asoc} ” o “ K_a ”, como se utiliza en la presente, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras que el término “ K_{dis} ” o “ K_d ”, como se utiliza en la presente, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. El término “ K_D ”, como se utiliza en la presente, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo, es utilizando resonancia con plasmón superficial, de manera preferida, utilizando un sistema biosensor, tal como el sistema Biacore®.

Como se utiliza en la presente, el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ o menos, de manera más preferida $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ o menos, aún de manera más preferida $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o menos, aún de manera más preferida $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menos y aún de manera más preferida $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menos para un antígeno objetivo. Sin embargo, la unión con “alta afinidad” pueden variar para otros isotipos del anticuerpo. Por ejemplo, la unión con “alta afinidad” para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-6} M o menos, de manera más preferida 10^{-7} M o menos, aún de manera más preferida 10^{-8} M o menos.

El término “epítipo” o “determinante antigénica” se refiere al sitio de un antígeno al cual una inmunoglobulina o un anticuerpo se unen de manera específica. Los epítipos pueden formarse tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegado terciario de una proteína. Los epítipos formados de los aminoácidos contiguos se retienen típicamente tras la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el pliegue terciario se pierden típicamente con el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen técnicas en el campo y aquéllas descritas en la presente, por ejemplo, cristalografía con rayos x y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones (véase, por ejemplo, *Epítipo Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

En consecuencia, también se divulgan los anticuerpos que se unen a (es decir, reconocen) al mismo epítipo que los anticuerpos descritos en la presente (es decir, PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14). Los anticuerpos que se unen al mismo epítipo, pueden identificarse por su capacidad para competir con (es decir, inhiben de manera competitiva la unión de) un anticuerpo de referencia a un antígeno objetivo, de una manera estadísticamente significativa. La inhibición competitiva puede ocurrir, por ejemplo, si los anticuerpos se unen a epítipos idénticos o estructuralmente similares (por ejemplo, epítipos que se superponen), o epítipos espacialmente proximales que, cuando se unen, causan impedimento estérico entre los anticuerpos.

La inhibición competitiva puede determinarse utilizando ensayos de rutina en los cuales la inmunoglobulina bajo prueba, inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Numerosos tipos de ensayos de unión competitiva son conocidos, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo con enzimas directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia intercalado (véase, 5 Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA con biotina-avidina directo en fase sólida (véase, Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo intercalado marcado directo en fase sólida (véase, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA marcado directo en fase sólida utilizando marcas con I-125 (véase, Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA con biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA marcado directo (Moldenhauer 10 *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Típicamente, tal ensayo involucra el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en la presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Usualmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la 15 unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común por al menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, métodos para representar el epítipo, tales como análisis con rayos x de los cristales de los complejos de antígeno:anticuerpo, que proporciona la resolución atómica del epítipo. Otros métodos para verificar la unión del anticuerpo a los fragmentos de antígeno o las variaciones mutadas del antígeno, en donde 20 la pérdida de unión debida a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia del antígeno, se considera con frecuencia una indicación de un componente del epítipo. Además, también pueden utilizarse métodos combinatorios computacionales para la correlación del epítipo. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar con afinidad los péptidos cortos específicos de las bibliotecas combinatorias del péptido de representación del fago. Los péptidos se consideran a continuación como líderes para la definición del 25 epítipo que corresponden al anticuerpo utilizado para seleccionar la biblioteca peptídica. Para la correlación del epítipo, también se han desarrollado algoritmos computacionales que han mostrado representar los epítipos conformacionales discontinuos.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier humano o animal no humano. El término "animal no humano", incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no 30 humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Diversos aspectos de la invención se describen con detalle adicional en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-Cadherina-17

Los anticuerpos de la invención están caracterizados por rasgos o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen de manera específica a la Cadherina-17 humana. De manera 35 preferida, un anticuerpo de la invención se une a Cadherina-17 con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 8×10^{-7} M o menos, aún de manera más típica, 1×10^{-8} M o menos. Los anticuerpos anti-Cadherina-17 de la invención, exhiben de manera preferida, una o más de las siguientes características:

se unen a la Cadherina-17 humana con una EC_{50} de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o de manera más preferida 10 pM o menos;

40 se unen a las células humanas que expresan a Cadherina-17.

En una realización, los anticuerpos se unen de manera preferida a un epítipo antigénico presente en la Cadherina-17, epítipo el cual no está presente en otras proteínas. Los anticuerpos de unen típicamente a la Cadherina-17, pero no se unen a otras proteínas, o se unen a proteínas con una baja afinidad, tal como una K_D de 1×10^{-6} M o más, de manera más preferida 1×10^{-5} M o más, de manera más preferida 1×10^{-4} M o más, de manera más 45 preferida 1×10^{-3} M o más, aún de manera más preferida 1×10^{-2} M o más. De manera preferida, los anticuerpos no se unen a las proteínas relacionadas, por ejemplo, los anticuerpos no se unen sustancialmente a otras moléculas de adhesión celular. Los anticuerpos de la invención son internalizados en una célula que expresa a Cadherina-17. Los ensayos estándar para evaluar la internalización del anticuerpo son conocidos en la técnica, incluyendo, por

ejemplo, un ensayo de internalización HumZap.

5 Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a Cadherina-17 son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, transferencias Western, RIA y análisis con citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen con detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos, también puede valorarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como el análisis del sistema Biacore®. Para valorar la unión a las células del tumor de los linfocitos B Raji o Daudi, las células Raji (No. de Depósito de la ATCC CCL-86) o Daudi (No. de Depósito de la ATCC CCL-213), pueden obtenerse de fuentes disponibles al público, tales como la colección Americana de Cultivos Tipo, y utilizarse en ensayos estándar, tales como análisis con citometría de flujo.

10 Anticuerpos monoclonales de la Invención

15 Los anticuerpos de la divulgación son los anticuerpos monoclonales humanos PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1-6. Las secuencias de aminoácidos de V_H PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs:35-46. Las secuencias de aminoácidos de V_K de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs:47-58.

20 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a Cadherina-17, las secuencias V_H y V_K pueden “mezclarse y aparearse” para crear otras que se unen a anti-Cadherina-17. La unión a Cadherina-17 de tales anticuerpos “mezclados y apareados”, puede probarse utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA). De manera preferida, cuando las cadenas V_H y V_K se mezclan y aparean, una secuencia V_H de un apareamiento V_H/V_K particular, se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. De igual manera, de manera preferida, una secuencia V_K de un apareamiento V_H/V_K particular se reemplaza con una secuencia V_K estructuralmente similar.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, que comprende:

30 una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos asentada en una SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 38, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos asentada en una SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste de 49, en donde el anticuerpo se une de manera específica a Cadherina-17, de manera preferida, Cadherina-17 humana.

También se divulgan aquí combinaciones de cadena pesada y ligera preferidas que incluyen:

35 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47; o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; o

40 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50; o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51; o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41; y una

- región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; o
- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; o
- 5 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54; o
- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55; o
- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56; o
- 10 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55; o
- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57; o
- 15 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58.
- En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden los CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de PTA001_A4. También se describen los anticuerpos que comprenden los CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14, o
- 20 combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de los V_H CDR1 de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs: 1-4. Las secuencias de aminoácidos de los V_H CDR2 de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs: 5-13. Las secuencias de aminoácidos de los V_H CDR3 de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs:14-21. Las secuencias de aminoácidos de los V_K CDR1 de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs:22-27. Las secuencias de aminoácidos de los V_K CDR2 de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs:28-31. Las secuencias de aminoácidos de los V_K CDR3 de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se muestran en SEQ ID NOs:32-34. Las regiones CDR son delineadas usando el sistema Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteínas of Immunological Interest, Fifth Edición, U.S. Department of Health y Human Services, NIH Publication No. 91-3242).
- Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a la Cadherina-17 y que la especificidad de unión al antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 V_H y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 V_K pueden “mezclarse y aparearse” (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y aparearse, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, CDR2 y CDR3 V_H y una CDR1, CDR2 y CDR3 V_K), para crear otras moléculas de unión a anti-Cadherina-17. En consecuencia, la divulgación incluye específicamente cada posible combinación de CDR de las cadenas pesada y ligera.
- 40 La unión de Cadherina-17 de tales anticuerpos “mezclados y apareados”, puede probarse utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, análisis ELISA, Biacore®). De manera preferida,
- 45

- cuando las secuencias CDR V_H se mezclan y aparean, las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H particular, se reemplazan con una secuencia CDR estructuralmente similar. De igual manera, cuando las secuencias CDR V_K se mezclan y aparean, las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_K particular, de manera preferida, se reemplaza con una secuencia CDR estructuralmente similar. Será fácilmente evidente para el experto con experiencia ordinaria, que las secuencias V_H y V_K novedosas, pueden crearse sustituyendo una o más de las secuencias de la región CDR V_H y/o V_L / V_K con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas en la presente para los anticuerpos monoclonales PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14.
- 5
- 10 En consecuencia, se describe aquí un anticuerpo monoclonal aislado, o porción que se une al antígeno del mismo, que comprende:
- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 1-4;
- 15 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 5-13;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 14-21;
- una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 22-27;
- 20 una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 28-31; y
- una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 32-34;
- 25 siendo posibles todas las combinaciones posibles, en donde el anticuerpo se une de manera específica a Cadherina-17, de manera preferida, Cadherina-17 humana.
- En un ejemplo, el anticuerpo comprende:
- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 1;
- una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 5;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 14;
- 30 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 22;
- una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 28; y
- una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 32.
- En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:
- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 2;
- 35 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 6;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 15;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 23;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

5 una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 7;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 16;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 23;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29; y

10 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 4;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 8;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 17;

15 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 24;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 30; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 34.

En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;

20 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 7;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 18;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 25;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 31; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

25 En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 9;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 19;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 26;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

- 5 una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;
una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 7;
una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 16;
una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 25;
una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 31; y

- 10 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;
una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 7;
una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 16;

- 15 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 25;
una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29; y
una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;
20 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 10;
una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 20;
una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 27;
una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29; y
una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

- 25 En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;
una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 11;
una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 21;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 25;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

5 una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 3;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 12;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 18;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 25;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 31; y

10 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

En otro ejemplo, el anticuerpo comprende:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 2;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 13;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 15;

15 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 23;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 29; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 33.

Es bien conocido en la técnica que el dominio CDR3, de manera independiente de los dominios CDR1 y/o CDR2, puede determinar solo la especificidad de unión de un anticuerpo a un antígeno análogo y que múltiples anticuerpos pueden generarse de manera predecible, que tienen la misma especificidad de unión basándose en una secuencia CDR3 común. Véase, por ejemplo, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado utilizando únicamente el dominio variable de cadena pesada CDR3 del anticuerpo anti-CD30 murino Ki-4); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (que describen los anticuerpos de la glucoproteína-2 epitelial recombinante (EGP-2), utilizando sólo la secuencia CDR3 de cadena pesada del anticuerpo anti-EGP-2 MOC-31 murino original); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (que describe un panel de anticuerpos $\alpha_v\beta_3$ de antiintegrina humanizados utilizando el dominio CDR variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo $\alpha_v\beta_3$ de antiintegrina murina LM609, en donde cada miembro de anticuerpo comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo murino original con afinidades tan altas o más altas que el anticuerpo murino original); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (que describe que el dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa a la unión al antígeno); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (que describe el injerto de las secuencias CDR3 de cadena pesada de tres Fab (SI-1, SI-40 y SI-32) contra el ADN de placenta humana en la cadena pesada de un Fab de toxoide antitetánico, reemplazando por lo tanto la CDR3 de cadena pesada existente, y demostrando que el dominio CDR3 solo, confiere especificidad de unión); y Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) (que describe estudios de injerto, en donde la transferencia de únicamente la CDR3 de cadena pesada de un Fab poliespecífico original LNA3 a una cadena pesada de un anticuerpo Fab p313 que se une al toxoide tetánico de IgG monoespecífico, fue suficiente para retener la especificidad de unión del Fab original).

En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más

- dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo derivado de un humano o un animal no humano, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse de manera específica a la Cadherina-17. Dentro de ciertos aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o rata, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse de manera específica a Cadherina-17. Dentro de algunas realizaciones, los anticuerpos inventivos que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir para unirse con; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar que el anticuerpo no humano original correspondiente.
- 5
- 10 Dentro de otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en donde el anticuerpo humano es capaz de unirse de manera específica a la Cadherina-17. Dentro de otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano, tal como,
- 15 por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse de manera específica a Cadherina-17, y en donde el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano, reemplaza un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión para Cadherina-17, para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse de manera específica a Cadherina-17. Dentro de algunas realizaciones, tales anticuerpos inventivos que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena
- 20 pesada y/o ligera del primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir para unirse con; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar que el primer anticuerpo humano original correspondiente.
- Anticuerpos que tienen secuencias de la línea germinal particulares
- 25 En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de la línea germinal particular y/o una región variable de cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de cadena ligera de la línea germinal particular.
- Por ejemplo, en una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción que se une al antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o se deriva de un gen V_H 7-39 murino, gen VH105 de la región II de V_H de murino, o un gen H17 de V_H de murino, en donde el anticuerpo se une de manera específica a Cadherina-17. En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción que se une al antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de, o se deriva de un gen V_K 1-110 de murino, un gen V_K 8-30 de murino o un gen 24-140 V_K de murino, en donde el anticuerpo se une de manera específica a Cadherina-17.
- 30
- 35 En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción que se une al antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:
- comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o que se deriva de un gen V_H 7-39 de murino (gen el cual incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 125); comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de, o que se deriva de un gen V_K 1-110 de murino (gen el cual incluye las secuencias de nucleótidos expuestas en la SEQ ID NO: 128 y 129); se une de manera específica a Cadherina-17, de manera preferida Cadherina-17 humana. Los ejemplos de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 7-39 y V_K 1-110, respectivamente, es PTA001_A1.
- 40
- En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción que se une a un antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:
- comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de o que se deriva de un gen H17 V_H II de murino o un gen VH105 de la región V_H II (los genes incluyen las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 126 y 127 respectivamente); comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen V_K 8-30 de murino (el gen incluye las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOs: 130, 131 y 132); y se une de manera específica a Cadherina-17, preferiblemente Cadherina-17 humana.
- 45

Ejemplos de un anticuerpo que tiene V_H del gen V_H II H17 o VH105 de la región V_H II y V_K de V_K 8-30 es PTA001_A4.

En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción que se une a un antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

- 5 comprende una región variable de cadena pesada que es el producto o se deriva de un gen H17 V_H II de murino o un gen VH105 de la región V_H II de murino (los genes incluyen las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 126 y 127 respectivamente); comprende una región variable de cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen V_K 24-140 de murino (el gen incluye las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NOs: 133, 134 y 135); y se une de manera específica a Cadherina-17, preferiblemente a Cadherina-17 humana. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H del gen H17 V_H II o VH105 de la región V_H II y V_K de V_K 24-140 son PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14.

- 15 Como se utiliza en la presente, un anticuerpo comprende las regiones variables de cadena pesada o ligera, que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de la línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de la línea germinal de murino. Tales sistemas incluyen seleccionar una biblioteca de genes de inmunoglobulina de murino representada en el fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal de murino puede identificarse como tal, comparando la secuencia de aminoácidos o nucleótidos del anticuerpo con las secuencias de aminoácidos o nucleótidos de las inmunoglobulinas de la línea germinal de murino, y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal de murino que está más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo. Un anticuerpo que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal de murino particular, puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o la introducción intencional de una mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal de murino, y contienen residuos de aminoácidos que identifican al anticuerpo como que es de murino cuando se compara con la secuencias de aminoácidos de la inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal humanas). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia de la línea germinal de murino particular, representará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal de murino. En ciertos casos, el anticuerpo puede representar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos homólogos

- 40 También se divulgan aquí anticuerpos que comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera, que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-Cadherina-17 de la invención.

Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción que se une al antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 35-46;

- 45 la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 47-58; y

el anticuerpo se une a la Cadherina-17 humana. Dichos anticuerpos pueden unirse a la Cadherina-17 humana con

un EC₅₀ de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferiblemente 10 pM o menos.

El anticuerpo también puede unirse a células CHO transfectadas con Cadherina-17 humana.

5 En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

10 En otros ejemplos, las secuencias de aminoácidos V_H y/o V_K pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_K que tienen alta homología (es decir, 80% o más) con las regiones V_H y V_K de las secuencias expuestas anteriormente, puede obtenerse mediante mutagénesis (por ejemplo, dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR) de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 59-83, seguido por la prueba del anticuerpo alterado codificado para la función retenida, utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

15 El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/total del # de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes siguientes.

20 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalización por la longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)), que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programas GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz de Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

30 De manera adicional o alterna, las secuencias de proteínas de la presente invención pueden utilizarse además, como una "secuencia de interrogación", para realizar una búsqueda contra las bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, calificación = 50, longitud de la palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas del anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) pueden utilizarse. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

35 Anticuerpos con modificaciones conservadoras

40 El anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde estas secuencias CDR comprende secuencias de aminoácidos especificadas, basándose en los PTA001_A4, o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-Cadherina-17 de la invención. En consecuencia, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción que se une al antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

45 la secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, y modificaciones conservadoras de las mismas;

la secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, y modificaciones conservadoras de las mismas; y

el anticuerpo se une a la Cadherina-17 humana. Tales anticuerpos pueden unirse a la Cadherina-17 humana con un EC_{50} de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferiblemente 10 pM o menos.

5 El anticuerpo también puede unirse a células CHO transfectadas con Cadherina-17 humana.

En una realización preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, y modificaciones conservadoras de las mismas. En otra realización preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, y modificaciones conservadoras de las mismas.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

15 Como se utiliza en la presente, el término “modificaciones conservadoras de la secuencia”, pretende referirse a modificaciones de los aminoácidos que no afectan o alteran de manera significativa las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en el campo, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de los aminoácidos son unas en las cuales el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención, pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede probarse para la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

La secuencia CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1-4 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; la secuencia CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22-27 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; la secuencia CDR2 de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 5-13 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; la secuencia CDR2 de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 28-38, puede comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; la secuencia CDR3 de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 14-21, puede comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; y/o la secuencia CDR3 de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 32-34 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos.

45 Anticuerpos que se unen al mismo epítipo como anticuerpos anti-Cadherina-17 de la invención

En otro ejemplo, la divulgación proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo en la Cadherina-17 humana, como cualquiera de los anticuerpos monoclonales de Cadherina-17 de la invención (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de competir de manera cruzada para unirse a la Cadherina-17 con cualquiera de los anticuerpos

monoclonales de la invención). En ejemplos preferidos, el anticuerpo de referencia para los estudios sobre la competencia cruzada para la unión, puede ser el anticuerpo monoclonal PTA001_A1 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 35 y 47, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A2 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 36 y 48, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal PTA001_A3 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 37 y 38, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A4 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 38 y 49, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A5 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 39 y 50, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A6 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 40 y 51, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A7 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 41 y 52, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A8 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 42 y 53, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A9 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 40 y 54, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A10 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 40 y 55, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A11 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 43 y 56, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A12 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 44 y 55, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA001_A13 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 45 y 57, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal PTA001_A14 (que tiene secuencias V_H y V_K como se muestra en las SEQ ID NOs: 46 y 58, respectivamente). Tales anticuerpos con competencia cruzada pueden identificarse basándose en su capacidad para competir de manera cruzada con PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14 en los ensayos de unión a Cadherina-17 estándar. Por ejemplo, el análisis BIAcore, los ensayos de ELISA o la citometría de flujo pueden utilizarse para demostrar la competencia cruzada para la unión con los anticuerpos de la presente invención. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14, a Cadherina-17 humana, demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14 para unirse a la Cadherina-17 humana y, por lo tanto, se une al mismo epítipo en la Cadherina-17 humana que PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14.

Anticuerpos diseñados y modificados

Un anticuerpo de la invención puede prepararse además, utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L divulgadas en la presente, puede utilizarse como una materia prima para diseñar un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado el cual puede tener propiedades alteradas en comparación con el anticuerpo inicial. Un anticuerpo puede diseñarse modificando uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de marco. De manera adicional o alterna, un anticuerpo puede diseñarse modificando los residuos dentro de las regiones constantes, por ejemplo, para alterar las funciones efectoras del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, el injerto de la CDR puede utilizarse para diseñar las regiones variables de los anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo de manera predominante a través de los residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones que determinan la complementariedad de la cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos naturales específicos, construyendo vectores de expresión que incluyen las secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en las secuencias del marco de un anticuerpo diferente, con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Véase. U.S.A.* 86:10029-10033; Patente de E.U.A. No. 5,225,539 de Winter, y las Patentes de E.U.A. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370, de Queen *et al.*).

En consecuencia, otra realización de la invención pertenece a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción que se

5 une al antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, que comprenden las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 17, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 30, y SEQ ID NO: 34, respectivamente. Así, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR V_H y V_K de los anticuerpos monoclonales PTA001_A4, aún pueden contener diferentes secuencias de marco de estos anticuerpos.

10 Tales secuencias de marco pueden obtenerse de las bases de datos públicas del ADN o las referencias publicadas, que incluyen las secuencias del gen del anticuerpo de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes murinos de la región variable de cadena pesada y ligera, pueden encontrarse en la base de datos de datos de la secuencia de la línea germinal de murino "IMGT" (International ImMunoGeneTics), (disponible en la Internet en imgt.cines.fr/) así como en Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de E.U.A., Publicación NIH No. 91-3242. Como otro ejemplo, las secuencias del ADN de la línea germinal para los genes murinos de la región variable de cadena pesada y ligera pueden encontrarse en la base de datos Genbank.

15 Las secuencias de proteínas del anticuerpo se comparan contra una base de datos de las secuencias de proteína recopilada, utilizando uno de los métodos de búsqueda de similitud de la secuencia llamados Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402), que es bien conocido por aquellos con experiencia en la técnica. BLAST es un algoritmo heurístico en que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de la base de datos, probablemente contiene pares de segmentos con alta calificación (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyas calificaciones no pueden mejorarse por extensión o corte, son llamados un blanco (*hit*). Brevemente, las secuencias nucleotídicas en la base de datos se traducen, y la región entre y que incluye la región del marco FR1 hasta FR3 se retiene. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud promedio de 98 residuos. Las secuencias duplicadas que son correspondencias exactas en toda la longitud de la proteína se eliminan. Una búsqueda BLAST para las proteínas utilizando el programa *blastp* con parámetros por defecto, estándar, excepto por el filtro de baja complejidad, que se apaga, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra los 5 mejores blancos que proporcionan las correspondencias de la secuencia. Las secuencias nucleotídicas se traducen en todos los seis marcos y el marco sin codones de paro en el segmento correspondiente de la secuencia de la base de datos, se considera el blanco potencial. Esto a su vez, se confirma utilizando el programa BLAST *tblastx*, que traduce la secuencia del anticuerpo en todos los seis marcos, y compara aquellas traducciones con las secuencias nucleotídicas en la base de datos traducidas de manera dinámica en los seis marcos.

35 Las identidades son las correspondencias exactas de aminoácidos entre la secuencia del anticuerpo y la base de datos de la proteína en toda la longitud de la secuencia. Los positivos (identidades + correspondencia de la sustitución), no son idénticos, sino sustituciones de aminoácidos guiadas por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia del anticuerpo corresponde con dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, se decidiría que el blanco con más positivos, es el blanco de la secuencia correspondiente.

40 Las secuencias de marco preferidas para utilizarse en los anticuerpos de la invención, son aquéllas que son estructuralmente similares a las secuencias de marco utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a las secuencias de marco V_H 7-39, la secuencia de marco del gen H17 V_H II, la secuencia de marco de V_H 105 de la región V_H II, la secuencia de marco V_K 1-110, la secuencia de marco V_K 8-30 y/o las secuencias de marco V_K 24-140 utilizadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 V_H , y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 V_K , pueden injertarse en regiones del marco que tiene la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal, de la cual se deriva la secuencia del marco, o las secuencias CDR pueden injertarse en las regiones de marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos, es benéfico mutar residuos dentro de las regiones de marco para mantener o mejorar la capacidad de unión del antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de E.U.A. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370, de Queen *et al.*).

50 Otro tipo de modificación de región variable es mutar los residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 V_H y/o V_K , para mejorar, por lo tanto, una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para

5 introducir las mutaciones y el efecto en la unión al anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, pueden evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. De manera preferida, se introducen modificaciones conservadoras (como se discutió anteriormente). Alternativamente, em algunos ejemplos pueden realizarse modificaciones no conservadoras. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de los aminoácidos, pero son de manera preferida sustituciones. Además, típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR son alterados, aunque como será apreciado por los expertos en la técnica, pueden ser mayores las variantes en otras áreas (por ejemplo las regiones de marco).

10 En consecuencia, en otra realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales anti-Cadherina-17 aislados, o porciones que se unen al antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada, que comprende: (a) una región CDR1 V_H que comprende la SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 4; (b) una región CDR2 V_H que comprende la SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 8; (c) una región CDR3 V_H que comprende la SEQ ID NO: 17, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 17; (d) una región CDR1 V_K que comprende la SEQ ID NO: 24, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 24; (e) una región CDR2 V_K que comprende la SEQ ID NOs: 30, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 30; y (f) una región CDR3 V_K que comprende la SEQ ID NO: 34, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 34.

25 Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos en los cuales se han hecho modificaciones a los residuos del marco dentro de V_H y/o V_K , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales medicaciones del marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos del marco en la secuencia de la línea germinal correspondiente. De manera más específica, un anticuerpo que se ha sometido a mutación somática, puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la cual se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse comparando las secuencias de marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las cuales se deriva el anticuerpo.

30 Otro tipo de modificación del marco involucra mutar uno o más residuos dentro de la región del marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de los linfocitos T para reducir por lo tanto la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también es referido como "desinmunización", y se describe con mayor detalle en la Publicación de la Patente de E.U.A. No. 20030153043, de Carr *et al.*

35 Además o de manera alterna a las modificaciones hechas dentro de las regiones del marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región F_c , típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación al complemento, unión al receptor F_c y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más porciones químicas pueden unirse al anticuerpo), o modificarse para alterar su glucosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con mayor detalle a continuación. La numeración de los residuos en la región F_c es aquella del índice de Kabat EU.

40 En una realización, la región de articulación de CH1 se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región de articulación se altera, por ejemplo, se incrementa o se disminuye. Este enfoque se describe además en la Patente de E.U.A. No. 5,677,425, de Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína en la región de articulación de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada, o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

50 En otra realización, la región de articulación F_c de un anticuerpo se muta para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. De manera más específica, una o más mutaciones de aminoácidos se introducen en la región de la

interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de articulación Fc, de manera que el anticuerpo tiene una unión dañada a la proteína A de *Estafilococo* (SpA) con relación a la unión a SpA del dominio de articulación Fc nativo. Este enfoque se describe con mayor detalle en la Patente de E.U.A. No. 6,165,745, de Ward *et al.*

5 En otra realización, el anticuerpo se modifica para incrementar su vida media biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones pueden introducirse: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de E.U.A. No. 6,277,375, de Ward. De manera alterna, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o C_L para contener un epítipo de unión al receptor silvestre, tomado de dos espiras de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,869,046 y 6,121,022, por Presta *et al.*

10 En otra realización, el anticuerpo se produce como un UniCuerpo (UniBody), como se describe en la WO/2007/059782.

15 En aún otras realizaciones, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácidos con un residuo de aminoácidos diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322, pueden reemplazarse con uno residuo de aminoácidos diferente, de manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector, pero retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al cual se altera la afinidad, puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con mayor detalle en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,624,821 y 5,648,260, ambas de Winter *et al.*

20 En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322, pueden reemplazarse con un residuo de aminoácidos diferente, de manera que el anticuerpo tiene una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Este enfoque se describe con mayor detalle en las Patentes de E.U.A. Nos. 6,194,551, por Idusogie *et al.*

25 En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para alterar por lo tanto, la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación del PCT WO 94/29351, por Bodmer *et al.*

30 En aún otro ejemplo, la región Fc se modifica para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc_γ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación del PCT WO 00/42072, de Presta. Además, se han descrito los sitios de unión en la IgG1 humana para Fc_γR1, Fc_γRII, Fc_γRIII y FcRn, se han representado y las variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339, mostraron mejorar la unión a Fc_γRIII. Además, los siguientes mutantes de combinación mostraron mejorar la unión a Fc_γRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Variantes adicionales de ADCC se describen por ejemplo en WO2006/019447.

40 En aún otro ejemplo, la región Fc es modificada para aumentar la vida media del anticuerpo, en general para aumentar la unión al receptor FcRn, como se describe por ejemplo en la PCT/US2008/088053, US 7,371,826, US 7,670,600 y WO 97/34631.

45 En aún otra realización, la glucosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, puede hacerse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede alterarse para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones del carbohidrato pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos pueden hacerse, que resultan en la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de la región del marco variable para eliminar, por lo tanto, la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con mayor detalle en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,714,350 y 6,350,861, por Co *et al.* y puede efectuarse al remover la asparagina en la posición 297.

De manera adicional o alterna, puede hacerse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac que se bisecan, incrementadas. Esto es denominado algunas veces en la técnica como una "glucoforma de ingeniería". Tales patrones de glucosilación alterados han demostrado incrementar la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones del carbohidrato pueden lograrse mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedera con una maquinaria de glucosilación alterada. Las células con maquinaria de glucosilación alterada, se han descrito en la técnica, y pueden utilizarse como células hospederas en las cuales se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención, para producir por lo tanto, un anticuerpo con glucosilación alterada. Se hace referencia a la tecnología POTELLIGENT®. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709, carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 FUT8^{-/-} se crearon por la ruptura seleccionada del gen FUT8 en las células CHO/DG44, utilizando dos vectores de reemplazo (véase la Publicación de la Patente de E.U.A. No. 20040110704, por Yamane *et al.* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, la EP 1,176,195, de Hanai *et al.*, describe una línea celular con un gen FUT8 roto funcionalmente, que codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6. Hanai *et al.*, también describen líneas celulares que tienen una actividad enzimática baja para agregar la fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo, o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata, YB2/0 (ATCC CRL 1662). La Publicación del PCT WO 03/035835, de Presta, describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir la fucosa a los carbohidratos enlazados a Asn(297), que resulta también en la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedera (véase también, Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La Publicación del PCT WO 99/54342, de Umana *et al.*, describe líneas celulares diseñadas para expresar las glucosil transferasas que modifican la glucoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas exhiben estructuras GlcNac que se bisecan incrementadas, lo que resulta en una actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). De manera alterna, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden escindirse utilizando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina los residuos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Como alternativa, las glucoformas diseñadas, particularmente la afucosilación, puede realizarse usando inhibidores de molécula pequeña de las enzimas de trayectoria de glucosilación. Véase por ejemplo Rothman *et al.*, *Mol. Immunol.* 26(12):113-1123 (1989); Elbein, *FASEB J.* 5:3055 (1991); PCT/US2009/042610 y la Patente de E.U.A. No. 7,700,321.

Otra modificación de los anticuerpos de la presente que está contemplada por la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, incrementar la vida media biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster o derivado de aldehído de PEG reactivo, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. De manera preferida, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación, o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se utiliza en la presente, el término "polietilenglicol", pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar otras proteínas, tales como monoalcoxi o ariloxi-polietilenglicol de (C1-C10) o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para la pegilación de las proteínas son conocidos en la técnica, y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, la EP 0 154 316, de Nishimura *et al.* y la EP 0 401 384, de Ishikawa *et al.*

En realizaciones adicionales, por ejemplo en el uso de los anticuerpos de la invención para fines de diagnóstico o detección, los anticuerpos pueden comprender una marca. Por "marcado" en la presente se entiende que un compuesto tiene al menos un elemento, isótopo o compuesto químico unido para permitir la detección del compuesto. En general, las marcas caen en tres clases: a) marcas isotópicas, que pueden ser radioactivas o isótopos pesados; b) magnéticos, eléctricos, térmicos; y c) tintes con color o luminiscentes; aunque las marcas incluyen enzimas y partículas tales como partículas magnéticas también. Las marcas preferidas incluyen, pero no se limitan a, complejos de lantánido fluorescentes (incluyendo esos de Europio y Terbio), y marcas fluorescentes que

incluyen, pero no se limitan a, puntos de cuantum, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, Malaquita verde, stilbena, Amarillo Lucifer, Azul Cascada, Rojo Texas, los tintes Alexa, los tintes Cy, y otros descritos en la 6a Edición del Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland.

Propiedades físicas del anticuerpo

- 5 Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse además, por varias propiedades físicas de los anticuerpos anti-Cadherina-17. Pueden utilizarse varios ensayos para detectar y/o diferenciar las varias clases de anticuerpos, basándose en estas propiedades físicas.

10 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glucosilación en la región variable de la cadena libre y pesada. La presencia de uno o más sitios de glucosilación en la región variable puede resultar en una inmunogenicidad incrementada del anticuerpo, o una alteración del pK del anticuerpo, debido a una unión al antígeno alterada (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* **41**:673-702; Gala FA and Morrison SL (2004) *J Immunol* **172**:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* **168**:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* **12**:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* **316**:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* **37**:697-706). Se sabe que la glucosilación ocurre en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glucosilación de la región variable puede probarse utilizando un ensayo Glycoblott, que escinde el anticuerpo para producir un Fab, y a continuación probar la glucosilación utilizando un ensayo que mide la oxidación del peryodato y la formación de la base de Schiff. De manera alterna, la glucosilación de la región variable puede probarse utilizando cromatografía con luz Dionex (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab a monosacáridos y analiza el contenido de sacáridos individual. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-Cadherina-17 que no contenga la glucosilación de la región variable. Esto puede lograrse seleccionando los anticuerpos que no contienen el motivo de glucosilación en la región variable o mutando los residuos dentro del motivo de glucosilación utilizando técnicas estándar bien conocidas en el campo.

25 En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios de isomerismo de asparagina. Puede ocurrir un efecto de desamidación o del ácido isoaspártico en las secuencias N-G o D-G, respectivamente. El efecto de desamidación o del ácido isoaspártico resulta en la creación de ácido isoaspártico que disminuye la estabilidad de un anticuerpo, creando una estructura burda de cadena lateral del término carboxi, más que en la cadena principal. La creación de un ácido isoaspártico puede medirse utilizando un ensayo iso-quant, que utiliza HPLC en fase inversa para probar el ácido isoaspártico.

30 Cada anticuerpo tendrá un punto isoelectrico (pI) único, pero generalmente los anticuerpos caerán en el intervalo de pH de entre 6 y 9.5. El pI para un anticuerpo de IgG1 típicamente cae dentro del intervalo de pH de 7-9.5 y el pI para un anticuerpo de IgG4 típicamente cae dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que está fuera de este intervalo. Aunque los efectos son generalmente desconocidos, existe la especulación de que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener algo de desplegado e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. El punto isoelectrico puede probarse utilizando un ensayo de enfoque isoelectrico capilar, que crea un gradiente de pH y puede utilizar enfoque láser para la exactitud incrementada (Janini *et al* (2002) *Electrophoresis* **23**:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* **53**:S75-89; Hunt *et al* (1998) *J Chromatogr A* **800**:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-Cadherina-17 que contenga un valor de pI que caiga en el intervalo normal. Esto puede lograrse ya sea seleccionando los anticuerpos con un pI en el intervalo normal, o mutando los residuos de la superficie cargada utilizando técnicas estándar bien conocidas en el campo.

40 Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de la estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* **3**:361-71). Una estabilidad térmica más alta, indica mayor estabilidad general del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse utilizando técnicas tales como calorimetría con exploración diferencial (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* **20**:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* **68**:47-52). T_{M1} indica la temperatura del desplegado inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura del desplegado completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que la T_{M1} de un anticuerpo de la presente invención sea mayor que 60°C, de manera preferida, mayor que 65°C, aún de manera más preferida, mayor que 70°C. De manera alterna, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse utilizando difracción circular (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* **40**:343-9).

En una realización preferida, los anticuerpos se seleccionan para que no se degraden rápidamente. La

fragmentación de un anticuerpo anti-Cadherina-17 puede medirse utilizando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, como es bien entendido en la técnica (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

5 En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tengan efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmune indeseada y/o a propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos son aceptables con una agregación de 25% o menos, de manera preferida 20% o menos, aún de manera más preferida 15% o menos, aún de manera más preferida 10% o menos y aún de manera más preferida 5% o menos. La agregación puede medirse mediante varias técnicas bien conocidas en el campo, incluyendo cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) en columna con exclusión de tamaño (SEC), y dispersión de la luz para identificar los monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

10 Métodos para diseñar los anticuerpos

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos anti-Cadherina-17 tienen secuencias V_H y V_K descritas en la presente, que pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos anti-Cadherina-17, modificando las secuencias V_H y/o V_K , o las regiones constantes unidas a las mismas. Así, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de un anticuerpo anti-Cadherina-17 de la invención, por ejemplo, PTA001_A4, se utilizan para crear anticuerpos anti-Cadherina-17 relacionados estructuralmente, que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a Cadherina-17 humana. Por ejemplo, una o más regiones CDR de PTA001_A4, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse de manera recombinante con las regiones de marco y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-Cadherina-17 diseñados de manera recombinante, adicionales, de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquéllas descritas en la sección
15
20
25
previa. La materia prima para el método de diseño es una o más de las secuencias V_H y/o V_K proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína), un anticuerpo que tenga una o más secuencias V_H y/o V_K proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. En su lugar, la información contenida en las secuencias, se utiliza como la materia prima para crear una secuencia de "segunda generación" derivada de la secuencia original, y a continuación la secuencia de la "segunda generación" se prepara y expresa como una proteína.

También se divulga un método para preparar un anticuerpo anti-Cadherina-17 que comprende:

30 proporcionar: (i) una secuencia del anticuerpo de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 1-4, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 5-13, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 14-21; y/o (ii) una secuencia del anticuerpo de la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 22-27, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 28-31, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 32-34;

35 alterar al menos un residuo de aminoácidos dentro de la secuencia del anticuerpo de la región variable de cadena pesada y/o la secuencia del anticuerpo de la región variable de cadena ligera, para crear al menos una secuencia del anticuerpo alterado; y

expresar la secuencia del anticuerpo alterada como una proteína.

40 Pueden utilizarse técnicas de biología molecular estándar para preparar y expresar la secuencia del anticuerpo alterada.

De manera preferida, el anticuerpo codificado por la secuencia del anticuerpo alterada, es uno que retiene una, algunas o todas de las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-Cadherina-17 descritos en la presente, propiedades funcionales las cuales incluyen, de manera no exclusiva:

unirse a Cadherina-17 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos;

45 unirse a las células CHO humanas transfectadas con Cadherina-17.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden valorarse utilizando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en la presente, tales como aquellos expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión).

5 En ciertas realizaciones de los métodos para diseñar los anticuerpos de la invención, pueden introducirse mutaciones de manera aleatoria o selectiva en toda o parte de una secuencia que codifica un anticuerpo anti-Cadherina-17 y los anticuerpos anti-Cadherina-17 modificados resultantes, pueden seleccionarse para la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Los métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la Publicación del PCT WO 02/092780, de Short, describe métodos para crear y seleccionar mutaciones del anticuerpo utilizando mutagénesis con saturación, montaje de ligadura sintética o una combinación de los mismos. De manera alterna, la Publicación del PCT WO 03/074679, de Lazar *et al.*, describe métodos para utilizar métodos de selección computacionales para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

15 Otro aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en las células completas, en un lisado celular, o en una forma modificada parcialmente o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está “aislado” o “se vuelve sustancialmente puro” cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis sobre gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

25 Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse utilizando técnicas de biología molecular estándar. Para los anticuerpos expresados por los hibridomas, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, hechas por el hibridoma, pueden obtenerse mediante técnicas estándar de amplificación con PCR o clonación del ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de representación del fago), los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo, pueden recuperarse de la biblioteca.

30 Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención, son aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L del anticuerpo monoclonal PTA001_A4. También se divulgan moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_H de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14, se muestran en las SEQ ID NOs: 59-70. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_L de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14, se muestran en las SEQ ID NOs: 71-83.

40 Otros ácidos nucleicos de la divulgación, son ácidos nucleicos que tienen al menos 80% de identidad de la secuencia, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de la secuencia, con una de las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 59-83, ácidos nucleicos los cuales codifican un anticuerpo de la divulgación, o una porción que se une al antígeno del mismo.

45 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos es el número de posiciones en la secuencia en las cuales el nucleótido es idéntico, tomando en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, tal como el algoritmo de Meyers y Miller o el programa XBLAST de Altschul descrito anteriormente.

Todaa través de más, los ácidos nucleicos preferidos de la divulgación comprenden una o más porciones que

5 codifican a CDR de las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en las SEQ ID NOs: 59-83. En este ejemplo, el ácido nucleico puede codificar la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14, o la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14.

10 Los ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de la secuencia, con tal porción que codifica a CDR de las SEQ ID NO: 59-83 (secuencias V_H y V_K), también son los ácidos nucleicos preferidos de la divulgación. Tales ácidos nucleicos pueden diferir de la porción correspondiente de las SEQ ID NO: 59-83 en una región que codifica una porción que no es CDR y/o en una porción que codifica CDR. En donde la diferencia está en una región que codifica CDR, la región CDR del ácido nucleico codificada por el ácido nucleico, típicamente comprende una o más modificaciones conservadoras de la secuencia como se definió en la presente, en comparación con la secuencia CDR correspondiente de PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 o PTA001_A14.

20 Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_K , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable a los de la cadena del anticuerpo de longitud completa, a genes del fragmento Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_K - o V_H - está enlazado de manera operable a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante del anticuerpo o un enlazante flexible. El término "enlazado de manera operable", como se utiliza en este contexto, pretende significar que dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

25 El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa enlazado de manera operable al ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada de murino, se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de E.U.A., Publicación NIH No. 91-3242), y los fragmentos de ADN que codifican estas regiones, pueden obtenerse mediante amplificación con PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero de manera más preferida, es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede enlazarse de manera operable a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante CH1 de cadena pesada.

35 El ADN aislado que codifica la región V_L / V_K puede convertirse a un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera Fab) enlazando de manera operable el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera de murino se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de E.U.A., Publicación NIH No. 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación con PCR estándar. En las realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

40 Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican a V_H - y V_L / V_K se enlazan de manera operable a otro fragmento que codifica un enlazante flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4 - Ser)_3$, de manera que las secuencias V_H y V_L / V_K pueden expresarse como una proteína de una sola cadena contigua, con las regiones V_L / V_K y V_H unidas por el enlazante flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554).

Producción de los anticuerpos monoclonales

De acuerdo con la invención la Cadherina-17 o un fragmento o derivado del mismo puede ser usado como un inmunogen para generar anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a tal inmunogen. Tales inmunogenes

- 5 pueden ser aislados por cualquier medio conveniente. Un experto en la técnica reconocerá que están disponibles muchos procedimientos para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Un experto en la técnica también apreciará que los fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan los anticuerpos también pueden ser preparados de información genética por diversos procedimientos (*Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebaeck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)).
- 10 En una realización de la invención, se producen anticuerpos para un dominio específico de Cadherina-17. En una realización específica, los fragmentos hidrofílicos de Cadherina-17 son usados como inmunógenos para la producción de anticuerpos.
- 15 En la producción de anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado puede efectuarse por técnicas conocidas en el campo, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico de Cadherina-17, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de Cadherina-17 que contiene dicho dominio. Para la selección de un anticuerpo que específicamente se une a un primer homólogo de Cadherina-17 pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) un segundo homólogo de Cadherina-17, se puede seleccionar con base en la unión positiva al primer homólogo de Cadherina-17 y una carencia de unión a (o unión reducida al) segundo homólogo de Cadherina-17. De igual manera, para la selección de un anticuerpo que específicamente se une a Cadherina-17 pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) un isoformo diferente de la misma proteína (tal como una glucoforma diferente que tiene el mismo péptido de núcleo que la Cadherina-17), se puede seleccionar con base en la unión positiva a la Cadherina-17 y una carencia de unión a (o unión reducida a) el diferente isoformo (por ejemplo una glucoforma diferente). Entonces, la presente invención proporciona un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (por ejemplo al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, particularmente al menos 10 veces mayor afinidad) a la Cadherina-17 que a un diferente isoformo o isoformas (por ejemplo glucoformas) de la Cadherina-17.
- 20
- 25 Los anticuerpos policlonales que pueden ser usados en los métodos descritos son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de suero de animales inmunizados. También puede usarse suero inmune no fraccionado. Diversos procedimientos conocidos en la técnica pueden ser usados para la producción de anticuerpos policlonales a la Cadherina-17, un fragmento de la Cadherina-17, un polipéptido relacionado a Cadherina-17, o un fragmento de un polipéptido relacionado a la Cadherina-17. Por ejemplo, una manera es purificar polipéptidos de interés o sintetizar los polipéptidos de interés usando, por ejemplo métodos de síntesis en la fase sólida bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., *Meth. Enzymol.* Vol 182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields ed., *Meth. Enzymol.* Vol 289 (1997); Kiso *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi *et al.*, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1: 255-60, 1995; Fujiwara *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Los polipéptidos seleccionados pueden entonces ser usados para inmunizar por inyección varios animales hospederos, incluyendo pero no limitado a conejos, ratones, ratas, etc., para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Diversos adyuvantes (es decir, inmunoestimulantes) pueden ser usados para mejorar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies hospederas, incluyendo, pero no limitado a, adyuvante de Freund completo o incompleto, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa tales como lisolectina, polioli plurónico, un polianión, un péptido, una emulsión de aceite, hemocianina de linfo de cerradura, dinitrofenol, y un adyuvante tal como BCG (bacilo Calmette-Guerin) o *corynebacterium parvum*. Adyuvantes adicionales también son bien conocidos en la técnica.
- 30
- 35
- 40 Para la preparación de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos hacia Cadherina-17, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495, así como la técnica del trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica del EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales puede ser cultivado *in vitro* o *in vivo*. En una realización adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en animales libres de gérmenes utilizando tecnología conocida
- 45
- 50

(PCT/US90/02545).

5 El sistema animal preferido para preparar los hibridomas es el sistema murino. La producción del hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de los esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos monoclonales incluyen pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo quimeras de humano-ratón).

10 Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención pueden prepararse basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se describió anteriormente. La codificación del ADN de las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse del hibridoma no humano de interés y diseñarse para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana), utilizando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden enlazarse a las regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, la Patente de E.U.A. No. 4,816,567, de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en un marco humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de E.U.A. No. 15 5,225,539, de Winter, y las Patentes de E.U.A. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370, de Queen *et al.*).

20 Los anticuerpos completamente humanos pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que pueden expresar los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humanos. Los ratones transgénicos son inmunizados de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo toda o una porción de Cadherina-17. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden ser obtenidos usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana portados por el ratón transgénico se rearreglan durante la diferenciación de los linfocitos B, y posteriormente se someten a conmutación de clase y mutación somática. Entonces, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos terapéuticamente útiles IgG, IgA, IgM y IgE. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en la presente como ratones de las razas HuMAb Mouse® (Medarex® Inc) y KM Mouse®. La raza HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.), se describe en Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir tales anticuerpos, véase *por ejemplo* la Patente de E.U.A 5,625,126; la Patente de E.U.A 5,633,425; la Patente de E.U.A 5,569,825; la Patente de E.U.A 5,661,016; 25 y la Patente de E.U.A 5,545,806. La raza KM mouse® strain se refiere a un ratón que porta un transgen de cadena pesada humano y un transcromosoma de cadena ligera humano y se describe a detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*

30

35 Todavía además, los sistemas de animales transgénicos alternos que expresan los genes de la inmunoglobulina humana, están disponibles en la técnica, y pueden utilizarse para crear anticuerpos anti-Cadherina-17 de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo referido el Xenomouse (Amgen, Inc.) puede utilizarse; tal ratón se describe en, por ejemplo, las Patentes de E.U.A. Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 y 6,162,963, de Kucherlapati *et al.*

40 Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica denominada como "selección guiada". En este enfoque se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers *et al.* (1994) *Bio/technology* 12:899-903).

45 Además, los sistemas de animales transcromosómicos alternos que expresan los genes de la inmunoglobulina humana, están disponibles en la técnica, y pueden utilizarse para crear anticuerpos anti-Cadherina-17. Por ejemplo, pueden utilizarse los ratones que portan el transcromosoma de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana, referidos como "ratón TC"; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica, vacas que portan los transcromosomas de la cadena pesada y ligera (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y la solicitud del PCT No. WO/2002/092812, y pueden utilizarse para crear anticuerpos anti-Cadherina-17 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse utilizando ratones SCID en los cuales las células inmunes humanas se han reconstituido, de manera que puede generarse una respuesta al anticuerpo humano tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,476,996 y 5,698,767, de Wilson *et al.*

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser generados por el uso de tecnología de despliegue de fagos para producir y seleccionar bibliotecas de polipéptidos para unirse a un objetivo seleccionado. Véase por ejemplo Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin *et al.*, *Science* 249, 404-6, 1990, Scott and Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; y Ladner *et al.*, Patente de E.U.A. No. 5,571,698. Un concepto básico de los métodos de despliegue de fagos es el establecimiento de una asociación física entre el ADN que codifica un polipéptido a ser
10 seleccionado y el polipéptido. Esta asociación física es proporcionada por la partícula del fago, que despliega un polipéptido como parte de un cápsido que encierra al genoma del fago que codifica al polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre polipéptidos y su material genético permite una selección simultánea de masa de grandes números de fagos que portan diferentes polipéptidos. Un fago que despliega un polipéptido con afinidad a un objetivo se une al objetivo y este fago es enriquecido por selección de afinidad al objetivo. La identidad de los
15 polipéptidos desplegados de estos fagos puede ser determinada de sus respectivos genomas. Usando estos métodos un polipéptido identificado como teniendo una afinidad de unión por un objetivo deseado puede entonces ser sintetizado a granel en medios convencionales. Véase por ejemplo la Patente de E.U.A. No. 6,057,098. En particular, tal fago puede ser utilizado para desplegar un dominio de unión a antígeno expresado de un repertorio o biblioteca de anticuerpo combinatorial (por ejemplo humano o murino). Un fago que expresa un dominio de unión a antígeno
20 que se une al antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con el antígeno, *por ejemplo* usando un antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos es típicamente un fago filamentosos incluyendo dominios de unión fd y M13 expresados de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpo Fv estabilizados con bisulfuro recombinantemente fusionados a la proteína del gen III o gen VIII del fago. Los métodos de despliegue de fago que pueden ser usados para formar los anticuerpos de la presente
25 invención incluyen esos descritos en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de E.U.A. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 30 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificadoras del anticuerpo del fago pueden ser aisladas y usadas para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresado en cualquier hospedera deseado, incluyendo células de mamífero, células de insectos, células de plantas, levadura, y bacterias, por ejemplo como se
35 describe a detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden ser empleadas usando métodos conocidos en la técnica tales como esos descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); y Sawai *et al.*, *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988).

Ejemplos de técnicas que pueden ser usadas para producir Fvs de una sola cadena y anticuerpos incluyen esos descritos en las Patentes de E.U.A. 4,946,778 y 5,258,498; Huston *et al.*, *Métodos in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988).

La invención proporciona fragmentos funcionalmente activos, derivados o análogos de las moléculas de inmunoglobulina de anti-Cadherina-17. Funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de producir anticuerpos anti-anti-idiotipo (es decir, anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una
45 realización particular la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede ser mejorado por delección del marco y las secuencias CDR que son C-terminales a la secuencia de CDR que específicamente reconoce el antígeno. Para determinar cuales secuencias de CDR se unen al antígeno, péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR pueden ser usados en ensayos de unión con el antígeno por cualquier método de
50 ensayo de unión conocido en la técnica.

La presente invención proporciona fragmentos de anticuerpo tales como, pero no limitados a, fragmentos F(ab')₂ y

5 fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden ser generados por técnicas conocidas. Los fragmentos F(ab')₂ consisten de la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada y son generados por digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab son generados al reducir los puentes bisulfuro de los fragmentos F(ab')₂. La invención también proporciona dímeros de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como Fvs o anticuerpos de una sola cadena (SCAs) (por ejemplo como se describe en la Patente de E.U.A. 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature 334:544-54), o cualquiera otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de una sola cadena son formados por el enlace de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente aminoácido, que resulta en un polipéptido de cadena simple. Las técnicas para el ensamble de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* pueden ser usados (Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041).

15 En otras realizaciones, la invención proporciona proteínas de fusión de las inmunoglobulinas de la invención (o fragmentos funcionalmente activos de las mismas), por ejemplo en donde la inmunoglobulina es fusionada a través de un enlace covalente (por ejemplo un enlace de péptido), en cualquiera del extremo N o el extremo C a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, preferiblemente una porción de al menos 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferiblemente la inmunoglobulina, o fragmento de la misma, está enlazada covalentemente a otra proteína en el extremo N del dominio constante. Como se estableció anteriormente, tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumentar la vida media *in vivo*, y mejorar el suministro de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmune.

25 Las inmunoglobulinas de la invención incluyen análogos y derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula en tanto que esa unión covalente no deteriore la unión inmuno-específica. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, los derivados y análogos de las inmunoglobulinas incluyen esos que han sido modificados adicionalmente, por ejemplo por glucosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización por grupos conocidos protectores/bloqueadores, disociación proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas puede ser realizada por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a disociación química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Inmunización de ratones

30 Los ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno de Cadherina-17 y/o Cadherina-17 recombinante, o células que expresan a Cadherina-17. De manera preferida, los ratones serán de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, una preparación purificada o recombinante (100 µg) del antígeno Cadherina-17 puede utilizarse para inmunizar al ratón con Ig humana intraperitonealmente.

35 La experiencia acumulativa con diversos antígenos ha mostrado que los ratones responden cuando se inmunizan intraperitonealmente (IP) con el antígeno en adyuvante completo de Freund. Sin embargo, los adyuvantes diferentes a Freund también se encuentran que son efectivos. Además, se encuentra que las células completas, en la ausencia del adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede verificarse durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede seleccionarse mediante ELISA (como se describe a continuación), para probar valoraciones satisfactorias. Los ratones pueden reforzarse intravenosamente con el antígeno por 3 días consecutivos antes del sacrificio y el retiro del bazo realizándose 5 días después. En una realización, pueden utilizarse las razas de ratón a/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me).

Generación de transfectomas que producen los anticuerpos monoclonales

45 Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de una célula hospedera utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección del gen como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos del anticuerpo de los mismos, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, pueden obtenerse mediante técnicas de biología

5 molecular estándar (por ejemplo, amplificación con PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés), y los ADN pueden insertarse en los vectores de expresión, de manera que los genes están enlazados de manera operable a las secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, el término “enlazado de manera operable”, pretende significar que un gen del anticuerpo se liga a un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector, sirven para su fusión pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la expresión de la célula hospedera utilizada.

10 La célula hospedera puede ser cotransfectada con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector codificando un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector codificando un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la misma expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un solo vector que codifica ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias codificadoras para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

20 Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligadura de los sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligadura con extremo romo si no hay presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente, pueden utilizarse para crear genes del anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo del anticuerpo, insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena pesada y constante de cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H está enlazado de manera operable al segmento C_H dentro del vector, y el segmento V_K está enlazado de manera operable al segmento C_L dentro del vector. De manera adicional o alterna, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula hospedera. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector, de manera que el péptido de señal está enlazado en el marco al término amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína que no es inmunoglobulina).

30 Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedera. El término “secuencia reguladora” pretende incluir promotores, mejoradores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica, que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedera a ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de las células hospederas de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de la proteína en las células de mamífero, tales como promotores y/o mejoradores derivados del citomegalovirus (CMV), Virus Simiano 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío mayor del adenovirus (AdMLP) y el polioma. De manera alterna, pueden utilizarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina y el promotor de β -globina. Toda a través de más, los elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor $SR\alpha$, que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición de terminal larga del tipo 1 del virus de la leucemia de los linfocitos T humana (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

45 Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospederas (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células hospederas en las cuales se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de E.U.A. Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedera en la cual se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para utilizarse en células hospederas de dhfr con selección/amplificación con metotrexato), y el neo gen (para la selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula hospedera mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término “transfección” pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción del ADN exógeno en una célula hospedera procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y lo similar. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospederas procarióticas o eucarióticas, la expresión de los anticuerpos en células eucarióticas, y de manera más preferida en células hospederas de mamífero, es más preferida, debido a que tales células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, tienen más probabilidad que las células procarióticas de montarse y secretar un anticuerpo doblado de manera apropiada e inmunológicamente activo. La expresión procariótica de los genes del anticuerpo se ha reportado como inefectiva para la producción de altos rendimientos de un anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células hospederas de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor de genes temprano intermedio principal del citomegalovirus humano (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2), células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador DHFR seleccionable, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para uso con células de mieloma NSO, otro sistema preferido de expresión es el sistema de expresión de genes GS descrito en WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338,841 (de Bebbington).

Puede usarse una variedad de sistemas de vector de expresión de hospedera para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de expresión de hospederas representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificadoras de interés pueden ser producidos y posteriormente purificados, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificadoras de nucleótidos adecuadas, expresar la molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de un bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias que codifican a anticuerpo; levadura (por ejemplo *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias que codifican a anticuerpo; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo baculovirus) que contienen las secuencias que codifican al anticuerpo; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo virus mosaico de coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo plásmido Ti) que contiene secuencias que codifican el anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que portan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus de vacuna 7.5K).

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión puede ser ventajosamente seleccionado dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que es expresada. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de tal proteína será producida, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados puede ser deseable. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, *EMBO J.* 2:1791), en el cual la secuencia codificadora a anticuerpo puede ser ligada individualmente dentro del vector en el marco con la región codificadora *lac Z* de manera que se produce la proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX pueden también ser usados para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden ser fácilmente purificadas de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatona-agarosa seguido por elución en presencia de glutatona libre. Los vectores pGEX son diseñados para incluir trombina o sitios de disociación de proteasa de factor Xa de manera que el producto del gen objetivo clonado puede ser liberado de la unidad estructural GST.

En un sistema de insecto, el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) es usado como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificadora a

anticuerpo puede ser clonada individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y colocada bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina). En células hospederas de mamífero, puede ser utilizado un número de sistemas de expresión a base de virus (por ejemplo un sistema de expresión de adenovirus).

5 Como se discutió anteriormente, una cepa de célula hospedera puede ser elegida para modular la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto del gen de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo glucosilación) y procesamiento (por ejemplo disociación) de los productos de proteína puede ser importante para la función de la proteína.

10 Para una producción a largo plazo de alto rendimiento de anticuerpos recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, las líneas de células que expresan de manera estable un anticuerpo de interés pueden ser producidas por transfección de las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de un elegible (por ejemplo neomicina o higromicina), y seleccionar la expresión del marcador elegible. Tales líneas de células diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que interactúan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

15 Los niveles de expresión de la molécula de anticuerpo pueden ser aumentados por amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, aumenta en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedera aumentará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

25 Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos son introducidos en células hospederas de mamíferos, los anticuerpos son producidos por cultivo de las células hospederas por un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospederas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células hospederas crecen. Una vez que la molécula de anticuerpo de la invención ha sido recombinantemente expresada, puede ser purificada por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad tal como con proteína A o antígeno específico, y cromatografía de columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquiera otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

30 Como alternativa, cualquier proteína de fusión puede ser fácilmente purificada al utilizar un anticuerpo específico para la proteína de fusión que es expresada. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht et al. permite la fácil purificación de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas de células humanas (Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8977). En este sistema, el gen de interés es subclonado en un plásmido de recombinación de vacuna de manera que el marco de lectura abierto del gen es translacionalmente fusionado a una etiqueta de extremo amino que consiste de seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como un dominio de unión de matriz para la proteína de fusión. Extractos de células infectadas con virus de vacuna recombinante son cargados en columnas de Ni²⁺ ácido nitriloacético-agarosa y las proteínas marcadas con histidina son selectivamente eluidas con regulador que contiene imidazol.

40 Caracterización del anticuerpo que se une a un antígeno

Los anticuerpos que son generados por estos métodos pueden ser seleccionados por primera selección de afinidad y especificidad con el polipéptido purificado de interés y, si se requiere, comparando los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con los polipéptidos que se desean excluir de la unión. Los anticuerpos pueden probarse para la unión a Cadherina-17 mediante, por ejemplo, ELISA estándar. El procedimiento de selección puede implicar la inmovilización de los polipéptidos purificados en pozos separados de placas de microvaloración. La solución que contiene un anticuerpo potencial o grupos de anticuerpos se coloca entonces en los pozos de microvaloración respectivos y se incuban por aproximadamente 30 min a 2h. Los pozos de microvaloración son lavados y un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina si los anticuerpos cultivados son anticuerpos de ratón) se añaden a los pozos y se incuban por aproximadamente 30

min y luego se lavan. El sustrato se añade a los pozos y aparecerá una reacción de color donde está presente el anticuerpo al polipéptido(s) inmovilizado.

5 Los anticuerpos así identificados pueden ser entonces analizados adicionalmente para afinidad y especificidad en el diseño de ensayo seleccionado. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína objetivo, la proteína objetivo purificada actúa como un estándar con la cual juzgar la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos usando los anticuerpos que han sido seleccionados. Debido a que la afinidad de unión de los diversos anticuerpos puede diferir; ciertos pares de anticuerpos (por ejemplo en ensayos intercalados) pueden interferir uno con el otro estéricamente, etc., el desempeño del ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad y especificidad absolutas de un anticuerpo.

10 Los expertos en la técnica reconocerán que pueden realizarse muchos acercamientos para producir anticuerpos o fragmentos de unión y examinar y seleccionar para afinidad y especificidad para los diversos polipéptidos, pero estos acercamientos no cambian el alcance invención.

15 Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados de anti-Cadherina-17 se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competición usando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados pueden ser realizados usando placas ELISA revestidas de Cadherina-17. La unión mAb biotinilada puede ser detectada con una sonda de un paso de avidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, el isotipo de ELISA puede ser realizado usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular.

20 Los anticuerpos anti-Cadherina-17 pueden ser probados además para reactividad con antígeno de Cadherina-17 por transferencia Western. Brevemente, la Cadherina-17 puede ser preparada y sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados son transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados con 10% de suero bovino fetal, y probados con los anticuerpos monoclonales a ser probados.

25 La especificidad de unión de un anticuerpo de la invención puede también ser determinada por monitorización de la unión del anticuerpo a células que expresan a Cadherina-17, por ejemplo por citometría de flujo. Típicamente, una línea celular, tal como una línea celular CHO, puede ser transfectada con un vector de expresión que codifica a Cadherina -17. La proteína transfectada puede comprender una etiqueta, tal como una etiqueta myc, preferiblemente en el extremo N, para detección usando un anticuerpo en la etiqueta. La unión de un anticuerpo de la invención a Cadherina-17 puede ser determinada por incubación de las células transfectadas con el anticuerpo, y detectando el anticuerpo unido. La unión de un anticuerpo a la etiqueta en la proteína transfectada puede ser usada como un control positivo.

30 La especificidad de un anticuerpo de la invención para Cadherina-17 puede ser además estudiado por determinación de sí o no el anticuerpo se une a otras proteínas, tal como otro miembro de la familia de Cadherina usando los mismos métodos por los cuales se determina la unión a Cadherina-17.

Inmunconjugados

40 En otro aspecto, la presente invención incorpora un anticuerpo anti-Cadherina-17, o un fragmento del mismo, conjugado a una unidad estructural terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados son denominados en la presente como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas son denominados como "inmunotoxinas." Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es dañino para (por ejemplo, mata) células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida,

busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramycin (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

- 5 Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden ser conjugadas a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliceamicinas, maytansinas y auriestatinas, y derivados de los mismos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliceamicina está comercialmente disponible (Mylotarg®; American Home Products).

10 Las citotoxinas pueden ser conjugadas a anticuerpos de la invención usando tecnología enlazante disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazantes que han sido usados para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazantes que contienen péptidos. Un enlazante puede ser elegido porque es, por ejemplo, susceptible a disociación por bajo pH dentro del compartimiento lisosomal o susceptible a disociación por proteasas, tal como proteasas preferencialmente expresadas en tejido de tumor tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

15 Ejemplos of citotoxinas son descritos, por ejemplo, en las Patentes de E.U.A. Nos. 6,989,452, 7,087,600, y 7,129,261, y en las Solicitudes PCT Nos. PCT/US2002/17210, PCT/US2005/017804, PCT/US2006/37793, PCT/US2006/060050, PCT/US2006/060711, WO2006/110476, y en la Solicitud de Patente de E.U.A. No. 60/891,028. Para discusión adicional de los tipos de citotoxinas, enlazantes y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

20

25 Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser conjugados a un isótopo radioactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radioactivos que pueden ser conjugados a anticuerpos para uso en diagnóstico o terapéuticamente incluyen, pero no se limitan, yodo131, indio111, itrio90 y lutetio177. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados son establecidos en la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados comercialmente disponibles, incluyen Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y métodos similares pueden ser usados para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

30 Los conjugados de anticuerpos de la invención pueden ser usados para modificar una respuesta biológica dada, y la unidad estructural de fármaco no deberá ser considerada como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la unidad estructural de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo del mismo, tal como abrin, ricin A, exotoxinas de pseudomonas, o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis de tumor o interferón-γ; o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonia de macrófago de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonia de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

35

40 Las técnicas para conjugar tal unidad estructural terapéutica a anticuerpos son bien conocidas, véase por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs in Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

45

Moléculas Biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención incorpora moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-

5 Cadherina-17, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones que se unen a un antígeno del mismo, puede ser derivado o enlazado a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une al menos a dos diferentes sitios de unión o moléculas objetivo. El anticuerpo de la invención puede de hecho ser derivado o enlazado a más de una otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos diferentes sitios de unión y/o moléculas objetivo; tales moléculas multiespecíficas también pretenden estar comprendidas por el término "molécula biespecífica" como se usa en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ser funcionalmente enlazado (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más de otras moléculas de unión, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que resulta una molécula biespecífica.

10 En consecuencia, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para Cadherina-17 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. En una realización particular de la invención, el segundo epítipo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, Fc γ RI humano (CD64) o un receptor Fc α humano (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unión tanto a Fc γ R o Fc α R que expresan células efectoras (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), y a células objetivo que expresan a Cadherina-17. Estas moléculas biespecíficas dirigen las células que expresan Cadherina-17 a células efectoras y activan las actividades de las células efectoras mediadas por el receptor Fc, tal como fagocitosis de células que expresan Cadherina-17, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), liberación de citocina, o generación de anión superóxido.

15 En una realización de la invención en la cual una molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-Cadherina-17. En una realización, la tercera especificidad de unión es una porción de factor anti-mejorador (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie involucrada en actividad citotóxica y de esta manera aumenta la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción de factor anti-mejorador" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y de esta manera resulta en una mejora del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o el antígeno de la célula objetivo. La "porción de factor anti-mejorador" puede unirse a un receptor Fc o a un antígeno de célula objetivo. Como alternativa, la porción de factor anti-mejorador puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la cual se unen la primera y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la porción de factor anti-mejorador puede unirse a células T citotóxicas (por ejemplo a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulta en un aumento en la respuesta inmune contra la célula objetivo).

20 En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab') $_2$, Fv, Fd, dAb o Fv de cadena simple. El anticuerpo puede también ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena simple como se describe en la Patente de E.U.A. No. 4,946,778 de Ladner *et al.*

25 En una realización, la especificidad de unión para un receptor Fc γ es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, la unión del cual no es bloqueada por inmunoglobulina G humana (IgG). Como se usa en la presente, el término "receptor IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ - ubicados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor soluble o de transmembrana que son agrupados en tres clases de receptor Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fc γ es Fc γ RI humano de alta afinidad. El Fc γ RI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad para el IgG monomérico (10^8 - 10^9 M $^{-1}$).

30 La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales preferidos anti-Fc γ son descritas en la Publicación PCT WO 88/00052 y en la Patente de E.U.A. No. 4,954,617 de Fanger *et al.* Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión del Fc γ del receptor y, entonces, sur unión no es bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos específicos anti-Fc γ RI útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está

disponible de la American Type Culture Collection, No. de Acceso ATCC HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo receptor anti-Fc γ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y la Publicación PCT WO 94/10332 de Tempest *et al.*. La línea celular que produce el anticuerpo H22 fue depositada en el American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene el no. de acceso CRL 11177.

En aún otras realizaciones preferidas, la especificidad de unión para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor IgA humano, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), la unión del cual es preferiblemente no bloqueada por inmunoglobulina A humana (IgA). El término "receptor IgA" pretende incluir el producto del gen de un gen α (Fc α RI) ubicado en el cromosoma 19. Este gen es conocido por codificar numerosas isoformas de transmembrana alternativamente divididas de 55 a 110 kDa. El Fc α RI (CD89) es constitutivamente expresado en monocitos/macrófagos, eosinófilos y granulocitos neutrofilos, pero no en poblaciones de células efectoras. El Fc α RI tiene afinidad por el medio ($\approx 5 \times 10^7$ M $^{-1}$) para ambos IgA1 y IgA2, lo que aumenta con la exposición a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc α RI fuera del dominio de unión del ligando IgA, han sido descritos (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

Fc α RI y Fc γ RI son receptores de activación preferidos para uso en las moléculas biespecíficas de la invención porque son (1) expresados principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas; (2) expresados a altos niveles (por ejemplo, 5,000-100,000 por célula); (3) mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median la presentación mejorada de antígeno de antígenos, incluyendo auto-antígenos, dirigidos a ellos.

Los anticuerpos que pueden ser empleados en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales de murino, humano, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden ser preparadas por conjugación de las especificidades de unión del constituyente, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-Cadherina-17, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada las especificidad de unión de la molécula biespecifica puede ser generada por separado y luego conjugada a la otra. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o entrelazamiento pueden ser usados para la conjugación covalente. Ejemplos agentes de entrelazamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen esos descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden ser conjugados a través de unión de sulfhidrilo a las regiones articuladas del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región articulada es modificada para contener un número par de residuos silfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden ser codificadas en el mismo vector y expresadas y ensambladas en la misma célula hospedera. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecifica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab') $_2$ o ligando x proteína Fab de fusión. Una molécula biespecifica de la invención puede ser una molécula de una sola cadena que comprende un anticuerpo de una sola cadena y un determinante de unión, o una molécula biespecifica de una sola cadena que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de una sola cadena. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas son descritos por ejemplo en las Patentes de E.U.A. Números 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; y 5,482,858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos puede ser confirmada mediante, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por

ejemplo, inhibición de crecimiento), ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos en general detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de particular interés al emplear un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden ser detectados usando por ejemplo, un anticuerpo enlazado a enzima o fragmento de anticuerpo que reconoce y específicamente se une a los complejos de anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos pueden ser detectados usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser radioactivamente marcado y usado en un radioinmunoensayo (RIA) (véase por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986.). El isótopo radioactivo puede ser detectado por tales medios como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autoradiografía.

Fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos

La presente invención no está limitada a los anticuerpos tradicionales, y puede practicarse a través del uso de fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos. Como se detalla a continuación, una amplia variedad de tecnologías de fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos se ha desarrollado ahora, y se conoce ampliamente en la técnica. Aunque varias de estas tecnologías, tales como los anticuerpos de dominio, Nanocuerpos (Nanobodies) y UniCuerpos (UniBodies) hacen uso de fragmentos de, u otras modificaciones de las estructuras de los anticuerpos tradicionales, también hay tecnologías alternas, tales como los Afficuerpos (Affybodies), DARPIn, Anticalinas, Avimeros y Versacuerpos (Versabodies) que emplean las estructuras de unión que, mientras que imitan la unión al anticuerpo tradicional, se generan de, y funcionan a través de mecanismos distintos.

Los Anticuerpos de Dominio (dAb) son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de los anticuerpos humanos. Los Anticuerpos de Dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de dAbs de VH y VL completamente humanos (más de diez miles de millones de secuencias diferentes en cada biblioteca), y utiliza estas bibliotecas para seleccionar los dAbs que son específicos para los objetivos terapéuticos. En contraste con muchos anticuerpos convencionales, los Anticuerpos de Dominio son bien expresados en los sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamífero. Los detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y los métodos de producción de los mismos, pueden obtenerse con referencia a Patentes de E.U.A. 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; E.U.A. No. de Serie 2004/0110941; solicitud de patente Europea No. 1433846 y Patentes Europeas 0368684 y 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

Los Nanocuerpos (Nanobodies) son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada naturales. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un solo dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De manera importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que aloja la capacidad de unión al antígeno completa del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanocuerpos (Nanobodies) tienen una alta homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos, y pueden humanizarse además sin ninguna pérdida de la actividad. De manera importante, los Nanocuerpos (Nanobodies) tienen un bajo potencial inmunogénico, que se ha confirmado en estudios con primates con compuestos que conducen a los Nanocuerpos (Nanobodies).

Los Nanocuerpos (Nanobodies) combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con las características importantes de los fármacos de molécula pequeña. Como los anticuerpos convencionales, los Nanocuerpos (Nanobodies) muestran una alta especificidad objetivo, alta afinidad por su objetivo y baja toxicidad inherente. Sin embargo, como los fármacos de molécula pequeña, pueden inhibir las enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras del receptor. Además, los Nanocuerpos (Nanobodies) son extremadamente estables, pueden administrarse por medios diferentes a la inyección (véase, por ejemplo, la WO 04/041867), y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los Nanocuerpos (Nanobodies) incluyen reconocer los epítopos no comunes u ocultos como resultado de su tamaño pequeño, unirse a las cavidades o sitios activos de las proteínas objetivo, con afinidad y selectividad, debido a su flexibilidad tridimensional única, de formato del fármaco, diseño de la vida media y facilidad y velocidad de descubrimiento del fármaco.

Los Nanocuerpos (Nanobodies) son codificados por genes únicos, y se producen de manera eficiente en casi todos

- 5 los hospederos procarióticos y eucarióticos, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, la US 6,765,087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, por ejemplo, la US 6,838,254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades de múltiples kilogramos de Nanocuerpos (Nanobodies). Debido a que los Nanocuerpos (Nanobodies) exhiben una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, pueden formularse como una solución lista para utilizarse con larga vida útil.
- El método de la Nanoclona (véase, por ejemplo, la WO 06/079372), es un método patentado para generar Nanocuerpos (Nanobodies), contra un objetivo deseado, basado en la selección de alto rendimiento automatizada de los linfocitos B, y podría utilizarse en el contexto de la presente invención.
- 10 Los Unicuerpos (UniBodies) son otra tecnología de fragmentos de anticuerpo; sin embargo, esta es una basada en el retiro de la región de articulación de los anticuerpos de IgG4. La supresión de la región de articulación resulta en una molécula que es esencialmente la mitad del tamaño de los anticuerpos de IgG4 tradicionales, y tiene una región de unión univalente más que la región de unión bivalente de los anticuerpos de IgG4. También es bien conocido que los anticuerpos de IgG4 son inertes, y por lo tanto no interactúan con el sistema inmune, lo que puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en donde no se desea la respuesta inmune, y esta ventaja se pasa a los UniCuerpos (UniBodies). Por ejemplo, los UniCuerpos (UniBodies) pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no destruir, las células a las cuales están unidos. Además, la unión del UniCuerpo (UniBody) a las células cancerosas no las estimula a proliferar. Además, debido a que los UniCuerpos (UniBodies) son de aproximadamente la mitad del tamaño de los anticuerpos de IgG4 tradicionales, pueden mostrar una mejor distribución sobre tumores sólidos más grandes, con una eficacia potencialmente ventajosa. Los UniCuerpos (UniBodies) son eliminados del cuerpo a una velocidad similar a los anticuerpos de IgG4 completos, y son capaces de unirse con una afinidad similar a sus antígenos como los anticuerpos completos. Los detalles adicionales de los UniCuerpos (UniBodies) pueden obtenerse con referencia a la patente WO2007/059782.
- 15 20 25 Las moléculas de Afficuerpos (Affybodies) representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteínas de 58 residuos de aminoácidos, derivados de uno de los dominios de unión de la IgG de la proteína A de estafilococo. Este dominio de haz de tres hélices se ha utilizado como una estructura para la construcción de bibliotecas de fagémidos combinatorios, de los cuales las variantes del Afficuerpo (Affybody) que seleccionan las moléculas deseadas, pueden seleccionarse utilizando la tecnología de representación del fago (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997; 15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur J Biochem* 2002; 269:2647-55). La estructura simple, robusta de las moléculas del Afficuerpo (Affybody) en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J Immunol Methods* 2002;261:199-211), y para inhibir las interacciones de los receptores (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affybody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003;16:691-7). Los detalles adicionales de los Afficuerpos (Affybodies) y los métodos de producción de los mismos, pueden obtenerse con referencia a la Patente de E.U.A. No. 5831012.
- 30 35 40 Los Afficuerpos (Affybodies) marcados también pueden ser útiles en aplicaciones de formación de imágenes para determinar la abundancia de las Isoformas.
- 45 50 Las DARPIn (Proteínas de Repetición de Ankirina Diseñadas) son un ejemplo de una tecnología de DRP (Proteína de Repetición Diseñada) de un mimético de anticuerpo, que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de los polipéptidos que no son anticuerpos. Las proteínas de repetición tales como la ankirina o las proteínas de repetición ricas en leucina, son moléculas de unión ubicuas, que aparecen, a diferencia de los anticuerpos, intra y extracelularmente. Su arquitectura modular única tiene como característica unidades estructurales que se repiten (repeticiones), que se apilan juntas para formar dominios de repetición alargados que representan superficies de unión al objetivo variables y modulares. Basándose en esta modularidad, pueden generarse bibliotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño de consenso de las repeticiones autocompatibles que representan residuos superficiales variables, y su montaje aleatorio en los dominios de repetición.

5 Las DARPin pueden producirse en sistemas de expresión bacteriana, a rendimientos muy altos, y pertenecen a las proteínas más estables conocidas. Las DARPin altamente específicas, de alta afinidad, para una amplia gama de proteínas objetivo, incluyendo receptores humanos, citocinas, cinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana, se han seleccionado. Puede obtenerse DARPin que tienen afinidades en el intervalo nanomolar o picomolar de un solo dígito.

10 Las DARPin se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo ELISA, ELISA intercalado, análisis con citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de microplaquetas, purificación por afinidad o transferencia Western. Las DARPin también han probado ser altamente activas en el compartimiento celular, por ejemplo, como proteínas marcadoras intracelulares, fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP). Las DARPin se utilizaron además para inhibir la CI50 en el intervalo pM. Las DARPin no son sólo ideales para bloquear las interacciones proteína-proteína, sino también para inhibir las enzimas. Las proteasas, cinasas y transportadores se han inhibido de manera exitosa, más frecuentemente con un modo de inhibición alostérico. Los enriquecimientos muy rápidos y específicos sobre el tumor y las relaciones tumor a sangre muy favorables, hacen a las DARPin bien adecuadas para los enfoques de diagnóstico *in vivo* o terapéuticos.

15 La información adicional con respecto a las DARPin y otras tecnologías de DRP, pueden encontrarse en la Publicación de la Solicitud de Patente de E.U.A. No. 2004/0132028, y la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional No. WO 02/20565.

20 Las anticalinas son una tecnología adicional de miméticos de anticuerpo, sin embargo, en este caso, la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que se expresan de manera natural y abundante en los tejidos humanos y en los fluidos corporales. Las lipocalinas han evolucionado para realizar una gama de funciones *in vivo*, asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un cilindro β conservado, que soporta cuatro espiras en un término de la proteína. Estas espiras forman la entrada a un receptáculo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula, constituyen la variación en la especificidad de unión entre las lipocalinas individuales.

25 Aunque la estructura general de las espiras hipervariables soportadas por el marco de la hoja β conservada es reminiscente de las inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren considerablemente de los anticuerpos en término del tamaño, estando compuestas de una sola cadena polipeptídica de 160-180 aminoácidos, que es marginalmente mayor que un solo dominio de inmunoglobulina.

30 Las lipocalinas son clonadas y sus espiras se someten a diseño con el fin de crear Anticalinas. Las bibliotecas de Anticalinas estructuralmente diversas se han generado, y la representación de la Anticalina permite la selección y clasificación de la función de unión, seguido por la expresión y producción de la proteína soluble para los análisis adicionales en sistemas procarióticos o eucarióticos. Los estudios han demostrado de manera exitosa que pueden desarrollarse Anticalinas que son específicas para virtualmente cualquier proteína objetivo humana, y que pueden aislarse y pueden obtenerse afinidades de unión en el intervalo nanomolar o mayor.

35 Las Anticalinas también pueden formatearse como proteínas de selección dobles, llamadas Duocalinas. Una Duocalina se une a dos objetivos terapéuticos separados en una proteína monomérica producida fácilmente, utilizando procesos de fabricación estándar, mientras que retienen la especificidad y afinidad objetivo, sin importar la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

40 La modulación de múltiples objetivos a través de una sola molécula, es particularmente ventajoso en las enfermedades conocidas por involucrar más de un solo factor causante. Además, los formatos de unión bi o multivalentes, tales como las Duocalinas, tienen un potencial significativo para dirigir las moléculas de la superficie celular en la enfermedad, mediar los efectos agonísticos en las trayectorias de transducción de la señal o inducir los efectos de internalización mejorados a través de la unión y agrupamiento de los receptores de la superficie celular.

45 Además, la alta estabilidad intrínseca de las Duocalinas es comparable con las Anticalinas monoméricas, ofreciendo una formulación y potencial de suministro flexibles para las Duocalinas.

La información adicional con respecto a las Anticalinas puede encontrarse en la Patente de E.U.A. No. 7,250,297, y la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional No. WO 99/16873.

5 Otra tecnología mimética del anticuerpo útil en el contexto de la presente invención son los Avímeros. Los Avímeros evolucionaron de una gran familia de dominios del receptor extracelular humano mediante mezclado del exón *in vitro* y representación del fago, generando proteínas con múltiples dominios con propiedades de unión e inhibidoras. El enlazado de múltiples dominios de unión independientes ha mostrado crear avidéz y resulta en una afinidad y especificidad mejoradas, en comparación con las proteínas de unión de un solo epítipo convencionales. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficiente de moléculas específicas para múltiples objetivos en *Escherichia coli*, termoestabilidad mejorada y resistencia a las proteasas. Se han obtenido Avímeros con afinidades subnanomolares contra una variedad de objetivos.

10 La información adicional con respecto a los Avímeros puede encontrarse en las Publicaciones de las Solicitudes de Patentes de E.U.A. Nos. 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

15 Los Versacuerpos (Versabodies) son otra tecnología mimética de anticuerpos que podría utilizarse en el contexto de la presente invención. Los Versacuerpos (Versabodies) son proteínas pequeñas de 3-5 kDa con más de >15% de cisteínas, que forman una estructura de alta densidad de disulfuro, reemplazando el núcleo hidrofóbico que tienen las proteínas típicas. El reemplazo de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos, que comprenden el núcleo hidrofóbico, con un pequeño número de disulfuros, resulta en una proteína que es más pequeña, más hidrofílica (menos agregación y sin unión específica), más resistente a las proteasas y al calor, y que tiene una densidad menor de epítopos de los linfocitos T, debido a que los residuos que contribuyen principalmente a la presentación del MHC son hidrofóbicos. Las cuatro de estas propiedades son bien conocidas por afectar la inmunogenicidad, y se espera que juntas causen una mayor disminución en la inmunogenicidad.

20

25 La inspiración para los Versacuerpos (Versabodies) viene de los biofarmacéuticos inyectables naturales producidos por las sanguijuelas, víboras, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que se sabe que exhiben una inmunogenicidad inesperadamente baja. Empezando con las familias de proteínas naturales seleccionadas, mediante el diseño y mediante selección, el tamaño, la hidrofobicidad, el procesamiento del antígeno proteolítico y la densidad del epítipo se reducen al mínimo a niveles bastante menores que el promedio para las proteínas inyectables naturales.

30 Dada la estructura de los Versacuerpos (Versabodies), estos miméticos de anticuerpo ofrecen un formato versátil que incluye valencias múltiples, especificidad múltiple, una diversidad de mecanismos de la vida media, módulos que seleccionan el tejido y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los Versacuerpos (Versabodies) son fabricados en *E. coli* a altos rendimientos, y debido a su hidrofiliidad y pequeño tamaño, los Versacuerpos (Versabodies) son altamente solubles y pueden formularse a altas concentraciones. Los Versacuerpos (Versabodies) son excepcionalmente estables con el calor (pueden someterse a ebullición), y ofrecen una vida útil extendida.

35 La información adicional con respecto a los Versacuerpos (Versabodies) puede encontrarse en la Publicación de la Solicitud de Patente de E.U.A. No. 2007/0191272.

40 La descripción detallada del fragmento de anticuerpo y las tecnologías miméticas del anticuerpo proporcionadas anteriormente, no pretende ser una lista extensa de todas las tecnologías que podrían utilizarse en el contexto de la presente especificación. Por ejemplo, y también no a manera de limitación, una variedad de tecnologías adicionales, incluyendo las tecnologías basadas en polipéptidos alternas, tales como fusiones de las regiones que determinan la complementariedad como se expone en Qui *et al.*, Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007), así como las tecnologías basadas en ácidos nucleicos, tales como las tecnologías del aptámero de ARN descritas en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,789,157, 5,864,026, 5,712,375, 5,763,566, 6,013,443, 6,376,474, 6,613,526, 6,114,120, 6,261,774 y 6,387,620, podrían utilizarse en el contexto de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porciones que se unen al antígeno del mismo, de la presente invención, formulados juntos con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o

moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos), que se unen a diferentes epítopos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-Cadherina de la presente invención combinado con al menos otro agente anti-tumor, o un agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en la terapia de combinación se describen con mayor detalle a continuación en la sección sobre los usos de los anticuerpos de la invención.

10 Como se utiliza en la presente, un “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y lo similar, que son fisiológicamente compatibles. De manera preferida, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

15 Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original, y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquéllas derivadas de los ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y lo similar, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y lo similar. Las sales de adición de base incluyen aquéllas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y lo similar, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y lo similar.

20 Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y lo similar; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y lo similar; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y lo similar.

30 Los ejemplos de los portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención, incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y lo similar), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de agentes surfactantes.

35 Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y lo similar. Puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y lo similar en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

40 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso de los mismos en las

composiciones farmacéuticas de la invención está contemplado. Los compuestos activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

5 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración del fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y lo similar), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de agentes surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. 10 La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse, incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

15 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado, con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, conforme se requiera, seguido por microfiltración con esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquéllos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y secado por congelación (liofilización), que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una 20 solución filtrada estéril previamente de los mismos.

25 La cantidad del ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una sola forma de dosificación, variará dependiendo del sujeto que esté siendo tratado, y del modo de administración particular. La cantidad del ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única, generalmente será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0.01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento del ingrediente activo, de manera preferida de aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, de manera más preferida de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento del ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

30 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, varias dosis divididas pueden administrarse con el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación, para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosificaciones unitarias para 35 los sujetos a ser tratados, cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención es dictada por, y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser logrado, y (b) la limitación inherente en la técnica de combinación de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

40 Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente de 0.01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedero. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar abarca la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una 45 vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-Cadherina-17 de la invención, incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal a través de administración intravenosa, con el anticuerpo que se proporciona utilizando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, a continuación cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

50 En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran

de manera simultánea, caso en el cual la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra usualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden, por ejemplo, ser semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre del anticuerpo al antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración del anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

De manera alterna, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, caso en el cual se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varía dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguido por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico y terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente poco frecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere algunas veces, hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y de manera preferida, hasta que el paciente muestra un alivio parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida del mismo, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico anterior del paciente siendo tratado, y factores similares bien conocidos en el campo médico.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-Cadherina-17 de la invención, resulta de manera preferida en una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y duración de los periodos libres de los síntomas de la enfermedad o una prevención del daño o discapacidad debida a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de los tumores Cadherina-17+, una "dosificación terapéuticamente efectiva" inhibe de manera preferida el crecimiento celular o el crecimiento del tumor por al menos aproximadamente 20%, de manera más preferida por al menos aproximadamente 40%, aún de manera más preferida por al menos aproximadamente 60%, y aún de manera más preferida por al menos aproximadamente 80% con relación a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento de un tumor puede evaluarse en un sistema de un modelo animal predictivo de la eficacia en los tumores humanos. De manera alterna, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el practicante con experiencia. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o aliviar de otra manera los síntomas en un sujeto. Alguien con experiencia ordinaria en la técnica será capaz de determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

Una composición de la presente invención puede administrarse a través de una o más rutas de administración, utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto, la ruta y/o el modo de administración, variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración preferidas para los anticuerpos de la invención incluyen rutas de administración intravenosas, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otra ruta parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", como se utiliza en la presente, significa modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección, e incluyen, de manera no exclusiva, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

De manera alterna, un anticuerpo de la invención puede administrarse a través de una ruta no parenteral, tal como ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, de manera intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

5 Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Los polímeros biocompatibles, biodegradables, pueden utilizarse, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o se conocen generalmente por aquellos con experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

15 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de E.U.A. No. 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para distribuir la medicación a una velocidad controlada; la Patente de E.U.A. No. 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente de E.U.A. No. 4,447,233, que describe una bomba de infusión de la medicación para suministrar la medicación a una velocidad de infusión precisa; la Patente de E.U.A. No. 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo del fármaco; la Patente de E.U.A. No. 4,439,196, que describe un sistema de suministro del fármaco osmótico que tiene compartimientos con múltiples cámaras; y la Patente de E.U.A. No. 4,475,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico. Muchos otros de tales implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro (BBB), excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurarse que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos para fabricar liposomas, véanse, por ejemplo, las Patentes de E.U.A. 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más unidades estructurales que se transportan de manera selectiva en las células u órganos específicos, mejorando así el suministro del fármaco dirigido (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Las unidades estructurales de selección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de E.U.A. 5,416,016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); un receptor de la proteína A tensoactiva (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y métodos

40 Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención, tienen numerosas utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*, que involucran el diagnóstico y el tratamiento de los trastornos mediados por la Cadherina-17.

45 En algunas realizaciones, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una variedad de trastornos. Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" pretende incluir humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad de la Cadherina-17. Los métodos son particularmente adecuados para tratar a pacientes humanos, que tienen un trastorno asociado con la expresión aberrante de la Cadherina-17. Cuando los anticuerpos para la Cadherina-17 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o de manera simultánea.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la invención para Cadherina-17, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para detectar de manera específica la expresión de Cadherina-17 en la superficie de las células, y además, pueden utilizarse para purificar la Cadherina-17 a través de la purificación con inmunoafinidad.

5 Adicionalmente, dada la expresión de Cadherina-17 en varias células tumorales, los anticuerpos humanos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención, pueden utilizarse para tratar a un sujeto con trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan a Cadherina-17 incluyendo, por ejemplo, cáncer colorrectal. Se ha demostrado que la Cadherina-17 se internaliza en la unión al anticuerpo como se ilustra en el Ejemplo 10 siguiente, habilitando así a los anticuerpos de la invención a ser usados en cualquier mecanismo de acción de carga, por ejemplo, un enfoque ADC, radioinmuno conjugado, o enfoque ADEPT.

10 En una realización, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas y composiciones multiespecíficas y biespecíficas) de la invención, pueden utilizarse para detectar niveles de Cadherina-17, o niveles de células que contienen Cadherina-17 en su superficie membranal, niveles los cuales pueden relacionarse entonces con ciertos síntomas de la enfermedad. De manera alterna, los anticuerpos pueden utilizarse para inhibir o bloquear la función del Cadherina-17, que a su vez, puede relacionarse con la prevención o alivio de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando por lo tanto a la Cadherina-17 como un mediador de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-Cadherina-17 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y Cadherina-17. Cualesquier complejos formados entre el anticuerpo y Cadherina-17 se detectan y comparan en la muestra y el control.

15 En otra realización, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos, moléculas y composiciones multiespecíficas y biespecíficas) de la invención, pueden probarse inicialmente para la actividad de unión asociada con un uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden probarse utilizando los ensayos de citometría de flujo descritos en los Ejemplos siguientes.

20 Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, inmunoconjugados y composiciones) de la invención tienen utilidad adicional en la terapia y en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la Cadherina-17. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunoconjugados, pueden utilizarse para provocar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento y/o destruir una célula que expresa la Cadherina-17; mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa la Cadherina-17 en la presencia de células efectoras humanas, o bloquear la unión del ligando de Cadherina-17 a Cadherina-17.

25 En una realización particular, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos, moléculas y composiciones multiespecíficas y biespecíficas) se utilizan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de cáncer relacionado con la Cadherina-17. Ejemplos de cáncer relacionado con la Cadherina-17 incluyen, entre otros, tejidos de cáncer humano que representan el cáncer colorrectal.

30 Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención *in vivo* e *in vitro*, son bien conocidos en la técnica, y pueden seleccionarse por aquellos con experiencia ordinaria. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y peso del sujeto, y la concentración y/o formulación de la composición del anticuerpo.

35 Como se describió previamente, los anticuerpos anti-Cadherina-17 de la invención pueden coadministrarse con uno u otros agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede enlazarse al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse de manera separada del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o de manera concurrente como el agente, o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerígena, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo e hidroxurea de ciclofosfamida que, por sí mismos, son únicamente efectivos a niveles que son tóxicos o subtóxicos para el paciente. El cisplatino se administra de manera intravenosa como una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la

- adriamicina se administra de manera intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. Otros agentes adecuados para la co-administración con los anticuerpos de la invención incluyen otros agentes usados para el tratamiento de cánceres, por ejemplo, cáncer pancreático o colorrectal, tales como Avastin®, 5FU y gemcitabina. La co-administración de los anticuerpos anti-Cadherina-17 humanos, o fragmentos que se unen al antígeno de los mismos, de la presente invención con los agentes quimioterapéuticos, proporciona dos agentes anticancerígenos que operan a través de un mecanismo diferente, que proporciona un efecto citotóxico a las células tumorales humanas. Tal coadministración puede solucionar problemas debido al desarrollo de resistencia a los fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales, que podría volverlas no reactivas con el anticuerpo.
- 5
- 10 Las células efectoras específicas del objetivo, por ejemplo, las células efectoras relacionadas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención, también pueden utilizarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para la selección, pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células citotóxicas naturales y otras células que portan el receptor de IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto a ser tratado. Las células efectoras específicas del objetivo pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de 10^8 - 10^9 pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la ubicación en la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral que expresa a Cadherina-17, y efectuar la destrucción de las células, por ejemplo, mediante fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.
- 15
- 20 La terapia con células efectoras específicas del objetivo puede realizarse en conjunto con otras técnicas para la eliminación de las células seleccionadas. Por ejemplo, la terapia antitumoral utilizando las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención y/o las células efectoras armadas con estas composiciones, puede utilizarse en conjunto con la quimioterapia. Además, la inmunoterapia de combinación puede utilizarse para dirigir dos diferentes poblaciones efectoras citotóxicas hacia el rechazo de la
- 25
- célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos anti-Cadherina-17 enlazados a RI anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 pueden utilizarse en conjunto con los agentes que se unen de manera específica al receptor de IgG o IgA.
- Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención también pueden utilizarse para modular los niveles de Fc γ R o Fc γ R en las células efectoras, tales como mediante la coronación y eliminación de los receptores en la superficie celular. Las mezclas de los receptores anti-Fc pueden utilizarse también para este propósito.
- 30
- 35 Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención, que tienen sitios de unión al complemento, tales como las porciones de IgG1, 2 o 3 o IgM que se unen al complemento, también pueden utilizarse en la presencia del complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende las células objetivo con un agente de unión de la invención, y las células efectoras apropiadas, pueden suplementarse mediante la adición del complemento o suero que contiene el complemento. La fagocitosis de las células objetivo recubiertas con un agente de unión de la invención puede mejorarse uniendo las proteínas del complemento. En otra realización, las células objetivo recubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención, pueden también lisarse por el complemento. En aún otra realización, las composiciones de la invención no activan el complemento.
- 40
- 45 Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención, también pueden administrarse junto con el complemento. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o el complemento. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento se localiza en proximidad cercana a los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. De manera alterna, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención y el complemento o el suero, pueden administrarse de manera separada.
- También se describen en la presente, kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados), e instrucciones para el uso. El kit puede contener además, uno o más reactivos adicionales, tales como un agente inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiactivo, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la
- 50

invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno de Cadherina-17 diferente del primer anticuerpo).

5 En consecuencia, a los pacientes tratados con las composiciones de anticuerpos de la invención se les puede administrar (antes de, de manera simultánea con, o después de la administración de un anticuerpo humano de la invención) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos.

10 En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse además, con un agente que modula, por ejemplo, mejora o inhibe, la expresión o actividad de los receptores Fc γ o Fc γ , por ejemplo, tratando al sujeto con una citocina. Las citocinas preferidas para la administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor que estimula la colonia del granulocito (G-CSF), factor que estimula la colonia del granulocito-macrófago (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), y factor de necrosis del tumor.

15 Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención, también pueden utilizarse para células objetivo que expresan a Fc γ R o Cadherina-17, por ejemplo, para marcar tales células. Para cada uso, el agente de unión puede enlazarse a la molécula que puede detectarse. Así, la invención proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan los receptores Fc, tales como Fc γ R o Cadherina-17. La marca detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

20 En un ejemplo particular, la divulgación proporciona métodos para detectar la presencia de un antígeno de Cadherina-17 en una muestra, o para medir la cantidad de antígeno de Cadherina-17, que comprende poner en contacto la muestra y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal, o una porción que se une al antígeno del mismo, que se une de manera específica a Cadherina-17, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y Cadherina-17. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra, comparada con la muestra de control, es indicativa de la presencia del antígeno de Cadherina-17 en la muestra.

25 También se describen métodos para tratar un trastorno mediado por la Cadherina-17 en un sujeto, por ejemplo, cánceres humanos, incluyendo cáncer colorrectal.

30 En aún otra realización, los inmunoconjugados de la invención pueden utilizarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcas, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.), a las células que tienen receptores de la superficie celular de Cadherina-17, enlazando tales compuestos al anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-Cadherina-17 puede conjugarse a cualquiera de los compuestos de toxinas descritos en las Patentes de E.U.A. Nos. 6,281,354 y 6,548,530, las publicaciones de patente de E.U.A. Nos. 20030050331, 20030064984, 20030073852 y 20040087497, o publicados en la WO 03/022806.

35 Así, la invención también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo* células que expresan a Cadherina-17 (por ejemplo, con una marca detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático).

De manera alterna, los inmunoconjugados pueden utilizarse para destruir las células que tienen receptores de la superficie celular de Cadherina-17, dirigiendo las citotoxinas o radiotoxinas a Cadherina-17.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

40 Construcción de una biblioteca de despliegue de fago

Una proteína recombinante compuesta de dominios 1-2 del dominio extracelular de Cadherina-17 (SEQ ID NO:136) fue generada en bacterias por métodos estándar recombinantes y usada como antígeno para inmunización (véase lo siguiente). Una proteína recombinante compuesta del dominio extracelular de longitud completa de Cadherina-17 (SEQ ID NO:137) fue también eucarióticamente sintetizada por métodos estándar recombinantes y usada para

selección.

Inmunización y aislamiento de ARNm

5 Una biblioteca de despliegue de fago para identificación de moléculas de unión a Cadherina-17 fue construida como sigue. Ratones A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.) fueron inmunizados intraperitonealmente con antígeno recombinante a Cadherina-17 (dominios 1-2 del dominio extracelular), usando 100 µg de proteína en adyuvante completo de Freund, en el día 0, y con 100 µg de antígeno en el día 28. Los sangrados de prueba de los ratones fueron obtenidos a través de punción del seno retro-orbital. Si, al probar las valoraciones, fueron consideradas altas por ELISA usando antígeno biotinilado de Cadherina-17 inmovilizado a través de Placas de Poliestireno Revestidas con neutravidin (Reacti-Unirse(TM) NeutrAvidin™, Pierce, Rockford, Ill.), los ratones fueron sobrealimentados con 100 µg de proteína en el día 70, 71 y 72, con subsiguiente sacrificio y extracción del bazo el día 77. Si las valoraciones de anticuerpo fueron consideradas no satisfactorias, los ratones fueron sobrealimentados con 100 µg de antígeno en el día 56 y se tomó una muestra de sangre en el día 63. Si se obtuvieron valoraciones satisfactorias, los animales fueron sobrealimentados con 100 µg de antígeno en el día 98, 99, y 100 y los bazos recolectados en el día 105.

15 Los bazos fueron recolectados en una campana de flujo laminar y transferidos a cajas petri, cortados y desechada la grasa y tejido conectivo. Los bazos fueron macerados rápidamente con el émbolo de una jeringa estéril de 5 cc en presencia de 1.0 ml de solución D (25.0 g guanidina tiocianato (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 29.3 ml de agua estéril, 1.76 ml 0.75 M citrato de sodio pH 7.0, 2.64 ml 10% sarkosyl (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 0.36 ml 2-mercaptoetanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)). Esta suspensión de bazo fue jalada a través de una aguja de calibre 18 hasta que todas las células fueron lisadas y la solución viscosa fue transferida a un tubo de microcentrifugación. La caja Petri fue lavada con 100 µl de solución D para recuperar cualquier bazo restante. Esta suspensión fue jalada a través de una aguja calibre 22 por 5-10 veces más.

25 La muestra fue dividida igualmente entre dos tubos de microcentrifugación y se añade lo siguiente, en orden, con la mezcla por inversión después de cada adición: 50 µl 2 M de acetato de sodio pH 4.0, 0.5 ml fenol saturado con agua (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 100 µl cloroformo/alcohol isoamílico 49:1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). La solución fue sometida a vórtice por 10 segundos e incubada en hielo por 15 min. Después de la centrifugación a 14 krpm por 20 min a 2-8 °C., la fase acuosa fue transferida a un tubo fresco. Un volumen igual de fenol saturado con agua:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1) fue añadido, y el tubo sometido a vórtice por diez segundos. Después de 15 min de incubación en hielo, la muestra fue centrifugada por 20 min a 2-8 °C., y la fase acuosa transferida a un tubo fresco y precipitado con un volumen igual de isopropanol a -20 °C. por un mínimo de 30 min. Después de centrifugación a 14 krpm por 20 min a 4 °C., el sobrenadante fue aspirado, los tubos girados brevemente y se removió toda traza de líquido de la perla de ARN.

35 Las perlas de ARN fueron disueltas en 300 µl de solución D, combinadas, y precipitadas con un volumen igual de isopropanol a -20 °C. por un mínimo de 30 min. La muestra fue centrifugada 14 krpm por 20 min a 4 °C., el sobrenadante fue aspirado como antes, y la muestra enjuagada con 100 µl de 70% etanol enfriado en hielo. La muestra fue de nuevo centrifugada a 14 krpm por 20 min a 4 °C., aspirada la solución de 70% etanol, y la perla de ARN perla secada al vacío. La perla fue resuspendida en 100 µl de agua estéril tratada con dietil pirocarbonato. La concentración fue determinada por A260 usando una absorbancia de 1.0 para una concentración de 40 µg/ml. Los ARN fueron almacenados a -80 °C.

40 Preparación de ADN complementario (ADNc)

45 El ARN total purificado de bazos de ratón como se describe anteriormente fue usado directamente como molde para la preparación de ADNc. ARN (50 µg) fue diluido a 100 µL con agua estéril, y 10 µL de 130 ng/µL oligo dT12 (sintetizado en un sintetizador Applied Biosistemas Model 392 ADN) fue añadido. La muestra fue calentada por 10 min a 70 °C., luego enfrada en hielo. Cuarenta µL 5* regulador de primera hebra fue añadido (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), junto con 20 µL 0.1 M ditiotreitól (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), 10 µL 20 mM deoxinucleosido trifosfatos (dNTP's, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y 10 µL de agua en hielo. La muestra fue entonces incubada a 37 °C. por 2 min. Diez µL de transcriptasa inversa (Superscript(TM) II, Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) fueron añadidos y continuó la incubación a 37 °C. por 1 hr. Los productos de ADNc fueron usados directamente para reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Amplificación de genes de anticuerpo por PCR

5 Para amplificar substancialmente todos los genes de cadena H y L usando PCR, se eligieron cebadores que corresponden a substancialmente todas las secuencias publicadas. Ya que las secuencias de nucleótidos del extremo amino de H y L contiene diversidad considerable, 33 oligonucleótidos fueron sintetizados para servir como cebadores en la dirección 5' para las cadenas H, y 29 oligonucleótidos fueron sintetizados para servir como cebadores en la dirección 5' para las cadenas kapa L como se describe en la Patente de E.U.A. Ser. No. 08/835,159, presentada el 4 de abril de 1997. Las secuencias de nucleótidos de región constante para cada cadena requirieron solo un cebador en la dirección 3' para las cadenas H y un cebador en la dirección 3' para las cadenas kapa L.

10 Una reacción en 50 µL fue realizada para cada par de cebador con 50 µmolar de cebador en la dirección 5', 50 µmolar de cebador en la dirección 3', 0.25 µL Taq ADN Polimerasa (5 unidades/µL, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 3 µL ADNc (preparado como se describió), 5 µL 2 mM dNTP's, 5 µL 10*⁶Taq ADN regulador de polimerasa con MgCl₂ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y H₂O to 50 µL. La amplificación fue realizada usando un ciclizador GeneAmp(R) 9600 thermal (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) con el siguiente programa de termociclo: 94 °C. por 1 min; 30 ciclos de 94 °C. por 20 seg, 55 °C. por 30 seg, y 72 °C. por 30 seg; 72 °C. por 6 min; 4 °C.

15 Los productos de ADNds del procedimiento PCR fueron luego sometidos a PCR asimétrico usando solo un cebador en la dirección 3' para generar substancialmente solo la hebra anti-sentido de los genes objetivo. Una reacción en 100 µL fue realizada para cada producto de ADNds con 200 µmolar de cebador en la dirección 3', 2 µL de producto ds-ADN, 0.5 µL Taq ADN Polimerasa, 10 µL 2 mM dNTP's, 10 µL 10*⁶Taq ADN regulador de polimerasa con MgCl₂ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y H₂O a 100 µL. Se usó el mismo programa de PCR descrito antes para amplificar el (ss)-ADN de una sola hebra.

20 Purificación de ADN de una sola hebra por cromatografía líquida de alto rendimiento y ADN de una sola hebra cinasante

25 Los productos ss-PCR de cadena H y los productos de PCR de una sola hebra de cadena L fueron precipitados por etanol añadiendo 2.5 volúmenes de etanol y 0.2 volúmenes de 7.5 M acetato de amonio e incubando a -20 °C. por al menos 30 min. El ADN fue perlado por centrifugación en una centrifuga Eppendorf a 14 krpm por 10 min a 2-8 °C. El sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y los tubos fueron brevemente girados una segunda vez. La última gota de sobrenadante fue removida con una pipeta. El ADN fue secado al vacío por 10 min en medio de calentamiento.

30 Los productos de la cadena H fueron combinados en 210 µL de agua y los productos de la cadena L fueron combinados por separado en 210 µL de agua. El ADN de una sola hebra fue purificado por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando un Hewlett Packard 1090 HPLC y una columna de intercambio de aniones Gen-Pak(TM) FAX (Millipore Corp., Milford, Mass.). El gradiente usado para purificar el AND de una sola hebra se muestra en el Cuadro 1, y la temperatura del horno fue 60 °C. La absorbancia fue monitorizada a 260 nm. El ADN de una sola hebra eluido de la HPLC fue recolectado en fracciones de 0.5 min. Las fracciones que contenían el ADN de una sola hebra fueron precipitadas en metanol, se formó una perla y se secaron como se describió antes. Las perlas de ADN fueron combinadas en 200 µL de agua estéril.

Tabla 1 - Gradiente de HPLC para purificación de ss-ADN

Tiempo (min)	%A	%B	%C	Flujo (ml/min)
0	70	30	0	0.75
2	40	60	0	0.75
17	15	85	0	0.75
18	0	100	0	0.75
23	0	100	0	0.75
24	0	0	100	0.75
28	0	0	100	0.75
29	0	100	0	0.75
34	0	100	0	0.75
35	70	30	0	0.75

Regulador A es 25 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0

Regulador B es 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8.0

Regulador C es 40 mM ácido fosfórico

5 El ADN de una sola hebra fue fosforilado en la dirección 5' para mutagénesis. Veinticuatro μL 10^* de regulador de cinasa (United States Biochemical, Cleveland, Ohio), 10.4 μL 10 mM adenosina-5'-trifosfato (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y 2 μL polinucleotido cinasa (30 units/ μL , United States Biochemical, Cleveland, Ohio) fueron añadidos a cada muestra, y los tubos fueron inculcados a 37 °C. por 1 hr. Las reacciones fueron detenidas al incubar los tubos a 70 °C. por 10 min. El ADN fue purificado con una extracción de fenol equilibrado con Tris (pH>8.0, United States Biochemical, Cleveland, Ohio):cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1) y una extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Después de las extracciones, el ADN fue precipitado en etanol y se formó en perlas como se describió antes. Las perlas de ADN fueron secadas, luego disueltas en 50 μL de agua estéril. La concentración fue determinada por medición de la absorbancia de una alícuota del ADN a 260 nm usando 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para una absorbancia de 1.0. Las muestras fueron almacenadas -20 °C.

15 Preparación de moldes de uracilo usados en la generación de bibliotecas de fago de anticuerpo de bazo

Se agregó un ml de cultivo durante la noche de *E. coli* CJ236 (BioRAD, Hercules, Calif.) a 50 ml 2*YT en un matraz agitado con deflectores de 250 ml. El cultivo fue criado a 37 °C. a OD600=0.6, inoculado con 10 μL de una dilución 1/100 de BS45 reserva de vector de fago (descrito en la Solicitud de Patente de E.U.A. Ser. No. 08/835,159, presentado en Abr. 4, 1997) y continuó el crecimiento por 6 hr. Aproximadamente 40 ml del cultivo fue centrifugado a 12 krpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante (30 ml) fue transferido a un tubo de centrifugación fresco y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos después de la adición de 15 μL de 10 mg/ml ARNseA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.). Los fagos fueron precipitados por the adición de 7.5 ml de 20% polietilen glicol 8000 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)/3.5M acetato de amonio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) e incubación en hielo por 30 min. La muestra fue centrifugada a 12 krpm por 15 min a 2-8 °C. El sobrenadante fue desechado cuidadosamente, y el tubo ligeramente girado para remover toda traza de sobrenadante. La perla fue resuspendida en 400 μL regulador alto en sales (300 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), y transferida a un tubo de 1.5 ml.

La reserva de fago fue extraída repetidamente con un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1) hasta que no fue visible ninguna traza de una interfaz blanca, y luego se extrajo con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). El ADN fue precipitado con 2.5 volúmenes que etanol y 1/5 volumen de 7.5 M de acetato de amonio y cinco o por 30 min a -20 °C. El ADN fue centrifugado a 14 krpm por 10 min a 4 °C., La perla fue la paga una vez con 70% de etanol frío, y secada al vacío. El ADN del molde de uracilo fue disuelta en 30 μL de agua estéril y se determinó la concentración por A260 usando una absorbancia de 1.0 para una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El molde fue diluido a 250 ng/ μL con agua estéril, se tomaron alícuotas, y se almacenó a -20 °C.

35 Mutagénesis del molde de uracilo con ss-ADN y electroporación en *E. Coli* para generar bibliotecas de fago de anticuerpos

Las bibliotecas de despliegue de fago de anticuerpos fueron generadas al introducir simultáneamente genes de cadena pesada y ligera de una sola hebra sobre un molde de uracilo de vector de despliegue de fago. Se realizó una mutagénesis típica a una escala de 2 μg por mezclado de lo siguiente en un tubo de reacción de 0.2 ml de PCR: 8 μL de (250 ng/ μL) del molde de uracilo, 8 μL de 10^* regulador de anillado (200 mM Tris pH 7.0, 20 mM MgCl_2 , 500 mM NaCl), 3.33 μL de inserto de cadena pesada de una sola hebra cinasado (100 ng/ μL), 3.1 μL inserto de cadena ligera de una sola hebra (100 ng/ μL), y agua estéril hasta 80 μL . El ADN fue anillado en un ciclizador GeneAmp(R) 9600 thermal usando el siguiente perfil térmico: 20 seg a 94 °C., 85 °C. por 60 seg, 85 °C. a 55 °C. en rampa sobre 30 min, manteniendo a 55 °C. por 15 min. El ADN fue transferido a hielo después de que terminó el programa. La extensión/ligadura fue realizada al añadir 8 μL de 10^* regulador de síntesis (5 mM cada dNTP, 10 mM ATP, 100 mM Tris pH 7.4, 50 mM MgCl_2 , 20 mM DTT), 8 μL T4 ADN ligasa (1 U/ μL , Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), 8 μL de T7 ADN polimerasa diluida (1 U/ μL , New England BioLabs, Beverly, Mass.) e incubando a 37 °C. por 30 min.

5 La reacción fue detenida con 300 µL de regulador del paro de mutagénesis (10 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA). El ADN de mutagénesis fue extraído una vez con fenol equilibrado (pH>8):cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1), una vez con cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), y el ADN fue precipitado en etanol a -20 °C. por al menos 30 min. El ADN fue perlado y el sobrenadante fue removido cuidadosamente como se describió antes. La mezcla fue girada brevemente de nuevo y se removieron todas las razas de etanol con una pipeta. La perla fue secada al vacío. El ADN fue resuspendido en 4 µL de agua estéril.

10 Un microlitro de ADN de mutagénesis (500 ng) fue transferido en 40 µl de *E. coli* DH12S electrocompetente (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) usando electroporación. Las células transformadas fueron mezcladas con aproximadamente 1.0 ml de células XL-1 durante la noche que fueron diluidas con caldo 2*YT a 60% del volumen original. Luego esta mezcla fue transferida a un tubo de cultivo estéril de 15-ml y se añadieron 9 ml de agar superior en una placa de Agar LB de 150-mm. Las placas fueron incubadas por 4 hrs a 37° C. y luego transferidas a 20° C. Durante la noche. Se formaron fagos de anticuerpos de primera ronda al eluir al fago fuera de las placas en 10 ml de 2*YT, girando los desechos y tomando el sobrenadante. Éstas muestras son las bibliotecas de despliegue de fago de anticuerpos usadas para seleccionar anticuerpos contra Cadherina-17. La eficiencia de las electroporaciones fue
15 medida al colocar en placas 10 µl de una dilución al 10⁻⁴ de células suspendidas en placas de agar LB, seguido por incubación durante la noche de las placas a 37 °C. La eficiencia fue calculada al multiplicar el número de placas en la placa de dilución al 10⁻⁴ por 10⁶. Las eficiencias de electroporación de la biblioteca son típicamente mayores que 1*10⁷ fagos bajo estas condiciones.

Transformación de *E. coli* por electroporación

20 Células electrocompetentes de *E. coli* células fueron congeladas en hielo. El ADN fue mezclado con 40 L de estas células al tomar suavemente con una pipeta las células hacia arriba y hacia abajo 2-3 veces, siendo cuidadoso de no introducir una burbuja de aire. Las células fueron transferidas a una cubeta Gene Pulser (hueco de 0.2 cm, BioRAD, Hercules, Calif.) que ha sido enfriada en hielo, de nuevo siendo cuidadoso de no introducir una burbuja de aire en la transferencia. La cubeta fue colocada en el pulsador de *E. coli* (BioRAD, Hercules, Calif.) y electroporada con el
25 voltaje establecido a 1.88 kV de acuerdo con la recomendación del fabricante. La muestra transformada fue inmediatamente resuspendida en 1 ml de caldo 2*YT o 1 ml de una mezcla de 400 µl 2*YT/600 µl durante la noche de células XL-1 y procesada de acuerdo los procedimientos.

Colocación en placas del fago M13 o células transformadas con reacción de mutagénesis de vector de despliegue de fago de anticuerpo

30 Se añadieron muestras de fago a 200 µL de un cultivo nocturno de *E. coli* XL1-Azul cuando se colocaron en placas en placas de agar LB de 100 mm o en 600 µL de células nocturnas cuando se colocaron en placas en placas de 150 mm en tubos de cultivo estériles de 15 ml. Después de añadir agar LB superior (3 ml para placas de 100 mm o 9 ml para placas de 150 mm, se almacenó el agar superior a 55 °C. (véase el Apéndice A1, Sambrook et al., supra.), La mezcla fue distribuida uniformemente en una placa de agar LB que fue previamente calentada (37 °C.-55 °C.) Para
35 remover cualquier exceso de humedad en la superficie del agar. Las placas fueron enfriadas a temperatura ambiente hasta que solidificó el agar superior. Las placas fueron invertidas e incubadas a 37 °C. según fue indicado.

Preparación de Cadherina-17 biotinilada y anticuerpos biotinilados

40 Un antígeno de Cadherina-17 recombinante concentrado (dominio extracelular de longitud completa) fue dializado extensamente en BBS (20 mM borato, 150 mM NaCl, 0.1% NaN₃, pH 8.0). Después de la diálisis, se hizo reaccionar 1 mg de Cadherina-17 (1 mg/ml en BBS) con un exceso molar de 15 veces de éster de biotina-XX-NHS (Molecular Probes, Eugene, Oreg., Solución de reserva en 40 mM en DMSO). La reacción fue incubada a temperatura ambiente por 90 min y luego templada con taurina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a una concentración final de 20 mM. La mezcla de reacción biotinilada fue entonces dializada contra BBS a 2-8 °C. Después de la diálisis, la
45 Cadherina-17 biotinilada fue diluida en un regulador amplificador (40 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mg/ml BSA, 0.1% Tween 20, pH 7.5), se tomaron alícuotas, y se almacenó a -80 °C. hasta que fue requerido.

Los anticuerpos se hicieron reaccionar con 3-(N-maleimidilpropionil)biotina (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) usando una cisteína libre ubicada en el extremo carboxi de la cadena pesada. Los anticuerpos fueron reducidos al añadir DTT a una concentración final de 1 mM por 30 min a temperatura ambiente. El anticuerpo reducido fue

pasado a través de una columna de desalación Sephadex G50 equilibrada en 50 mM fosfato de potasio, 10 mM ácido bórico, 150 mM NaCl, pH 7.0. 3-(N-maleimidilpropionil)-biotina fue añadido a una concentración final de 1 mM y la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente por 60 min. Luego las muestras fueron extensamente dializadas contra BBS y almacenadas a 2-8 °C.

5 Preparación de látex magnético de avidina

El látex magnético (Estapor, 10% de sólidos, Bangs Laboratories, Fishers, Ind.) fue resuspendido perfectamente y se tomaron alícuotas de 2 ml en un tubo cónico de 15 ml. El látex magnético fue suspendido en 12 ml de agua destilada y separado de la solución por 10 min usando un imán (PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.). Mientras se mantenía la separación del látex magnético con el imán, el líquido fue cuidadosamente removido usando una pipeta de 10 ml estéril. Este procedimiento de lavado fue repetido tres veces más. Después del lavado final, el látex fue resuspendido en 2 ml de agua destilada. En un tubo cónico separado de 50 ml, se disolvieron 10 mg de avidina-HS (NeutrAvidin, Pierce, Rockford, Ill.) en 18 ml de 40 mM Tris, 0.15 M cloruro de sodio, pH 7.5 (TBS). Mientras se sometió a vórtice, los 2 ml del látex magnético fueron añadidos a la avidina-HS diluida y la mezcla se mezcló por otros 30 segundos. Esta mezcla fue incubada a 45 °C. por 2 hr, agitando cada 30 minutos. El látex magnético de avidina fue separado de la solución usando un imán y se lavó tres veces con 20 ml de BBS como se describió antes. Después del lavado final, el látex fue resuspendido en 10 ml de BBS y almacenado a 4 °C.

Inmediatamente antes del uso, el látex magnético de avidina fue equilibrado en regulador de amplificación (40 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mg/ml BSA, 0.1% Tween 20, pH 7.5). El látex magnético de avidina necesario para un experimento de amplificación (200 µl/muestra) fue añadido a un tubo de centrifugación estéril de 15 ml y llevado a 10 ml con regulador de amplificación. Estuvo fue colocado sobre el imán por 10 min para separar el látex. La solución fue cuidadosamente removida con una pipeta estéril de 10 ml como se describió antes. El látex magnético fue re suspendido en regulador de amplificación para iniciar el segundo lavado. El látex magnético fue lavado un total de 3 veces con regulador de amplificación. Después del lavado final, el látex fue resuspendido en regulador de amplificación al volumen inicial.

25 Ejemplo 2

Selección de anticuerpos recombinantes policlonales al antígeno de Cadherina-17

Los reactivos de unión que se unen específicamente a Cadherina-17 fueron seleccionados de las bibliotecas de despliegue de fagos creadas a partir de ratones hiperinmunizados como se describió en el Ejemplo 1.

Amplificación

30 Los fagos de anticuerpo de primera ronda fueron preparados como se describió en el Ejemplo 1 usando un molde de uracilo BS45. Las electroporaciones del ADN de mutagénesis fueron realizadas produciendo muestras de fagos derivadas de diferentes ratones inmunizados. Para crear más diversidad en la biblioteca policlonal recombinante, cada muestra de fago fue amplificada por separado.

35 Antes de la primera ronda de amplificación funcional con antígeno de Cadherina-17 biotinilado, se seleccionaron bibliotecas de fagos de anticuerpos para que los fagos desplegaran tanto cadenas pesadas como ligeras en su superficie por amplificación con látex magnético 7F11 (como se describe en los Ejemplos 21 y 22 de la Solicitud de Patente de E.U.A. Ser. No. 08/835,159, presentada en Abr. 4, 1997). La amplificación funcional de estas bibliotecas enriquecidas fue realizada en principio como se describe en el Ejemplo 16 de la solicitud de Patente de E.U.A. Ser. No. 08/835,159. Específicamente, 10 µL de 1×10^{-6} M de antígeno de Cadherina-17 biotinilado antígeno fue añadido a las muestras de fagos (aproximadamente una concentración final de 1×10^{-8} M de Cadherina-17), y la mezcla se dejó llegar al equilibrio durante la noche a 2-8 °C.

45 Después de alcanzar el equilibrio, las muestras fueron amplificadas con látex magnético de avidina para capturar el fago del anticuerpo unido a la Cadherina-17. El látex magnético de avidina equilibrado (Ejemplo 1), 200 µL látex por muestra, fue incubado con el fago por 10 min a temperatura ambiente. Después de 10 min, aproximadamente 9 ml de regulador de amplificación fue añadido a cada muestra de fago, y y se separó el látex magnético de la solución usando un imán. Después de una separación de diez minutos, el fago sin unir fue removido cuidadosamente usando

una pipeta estéril de 10 ml. El látex magnético fue entonces resuspendido en 10 ml de regulador densificación para iniciar el segundo lavado. El látex fue lavado un total de tres veces como se describió antes. Para cada lavado, los tubos se pusieron en contacto con el imán por 10 min para separar al fago separados sin unir del látex magnético. Después de la tercera lavada, el látex magnético fue resuspendido en 1 ml de regulador de amplificación y transferido a un tubo de 1.5 mL. El volumen completo del látex magnético de cada muestra fue entonces recolectado y resuspendido en 200 μ l 2*YT y colocado en placas LB de 150 mm como se describió en el Ejemplo 1 para amplificar al fago unido. Las placas fueron incubadas a 37 °C. por 4 hr, luego durante la noche a 20 °C.

Las placas de 150 mm usadas para amplificar el fago unido fueron usadas para generar la siguiente ronda de fagos de anticuerpos. Después de incubación durante la noche, la segunda ronda de fagos de anticuerpos fueron eluidos a partir de placas de 150 mm al pipetear 10 mL de medio 2*YT sobre el tamiz y agitando suavemente la placa a temperatura ambiente por 20 min. Las muestras de fago fueron transferidas a tu voz de centrifugación estériles desechables de 15 ml con un tapón de sello obturador, y los desechos de la placa LB fueron peletizados al centrifugar los tubos por 15 min a 3500 rpm. El sobrenadante que contenía la segunda ronda de fagos de anticuerpos fue entonces transferido a un nuevo tubo.

Se estableció una segunda ronda de amplificación funcional al diluir 100 μ L de cada reserva de fago en 900 μ L de regulador de amplificación en tubos de centrifugación estériles desechables de 15 ml. El antígeno de Cadherina-17 biotinilado fue entonces añadido a cada muestra como se describió para la primera ronda de amplificación, y las muestras de fago fueron incubadas por 1 hr a temperatura ambiente. Las muestras de fagos fueron entonces amplificadas con látex magnético de avidina como se describió antes. Se monitorizó el progreso de la amplificación en este punto al colocar alícuotas en placas de cada muestra de látex en placas de agar LB de 100 mm LB para determinar el porcentaje de positivos de kapa. La mayor parte del látex de cada amplificación (99%) fue colocado en placas de agar LB de 150 mm para amplificar el fago unido al látex. Las placas de agar LB de 100 mm fueron incubadas a 37 °C. por 6-7 hr, después de lo cual las placas fueron transferidas a temperatura ambiente y se tendieron filtros de nitrocelulosa (tamaño del poro de 0.45 mm, BA85 Protran, Schleicher y Schuell, Keene, N.H.) sobre las placas.

Las placas con filtros de nitrocelulosa fueron incubadas durante la noche a temperatura ambiente y luego se desarrollaron con un conjugado de fosfatasa alcalina kapa cabra anti-ratón para determinar el porcentaje de positivos kapa como se describe a continuación. Las muestras de fago con menores porcentajes (<70%) de positivos kapa en la población fueron sometidos a una ronda de amplificación con látex magnético 7F11 antes de realizar una tercera ronda funcional de amplificación durante la noche a 2-8 °C. usando antígeno de Cadherina-17 biotinilado a aproximadamente 2×10^{-9} M. esta ronda de amplificación también fue monitorizada para los positivos kapa. Las muestras individuales de fagos que tuvieron porcentajes positivos de kapa mayores que 80% fueron combinadas y sometidas a una ronda final de amplificación durante la noche a 2-8 °C. a 5×10^{-9} M de Cadherina-17. Los genes de anticuerpo contenidos dentro del fago eluido de esta cuarta ronda de densificación funcional fueron subclonados en el vector de expresión, pBRncoH3.

El procedimiento de subclonación fue realizado en general como se describe en el Ejemplo 18 de la solicitud de Patente de E.U.A. Ser. No. 08/835,159. Después de la subclonación, el vector de expresión fue electroporado en células DH10B y la mezcla se dejó crecer durante la noche en 2*YT que contenía 1% de glicerol y 10 μ g/ml de tetraciclina. Después de una segunda ronda de crecimiento y selección en tetraciclina, alícuotas de las células fueron congeladas a -80° C. Como la fuente de producción de anticuerpos policlonales para Cadherina-17. Los anticuerpos monoclonales fueron seleccionados de esas mezclas policlonales al colocar en placas una muestra de la mezcla en placas de agar LB que contenían 10 μ g/ml de tetraciclina y se examinó para anticuerpos que reconocieron la Cadherina-17.

Expresión y purificación de anticuerpos recombinantes contra Cadherina-17

Se generó un inoculado en un matraz agitado durante la noche a -70 °C. De un banco de células en un agitador incubador Innova 4330 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.) ajustado a 37 °C., 300 rpm. El inoculado fue usado para sembrar un fermentador de 20 L (Applikon, Foster City, Calif.) que contenía un medio de cultivo definido (Pack et al. (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277) suplementado con 3 g/L L-leucina, 3 g/L L-isoleucina, 12 g/L digestor de caseína (Difco, Detroit, Mich.), 12.5 g/L glicerol y 10 μ g/ml tetraciclina. La temperatura, pH y oxígeno disuelto en el fermentado fueron controlados a 26 °C., 6.0-6.8 y 25% de saturación, respectivamente. Se controló la

5 espuma por adición de propilen glicol (Dow, Midland, Mich.). Se añadió glicerol al fermentado en un modo alimentado por lo que es. Se indujo la expresión Fab por adición de L(+)-arabinosa (Sigma, St. Louis, Mo.) a 2 g/L durante la fase tardía de crecimiento logarítmico. Se midió la densidad celular por la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro UV-1201 (Shimadzu, Columbia, Md.). Después del término de la corrida y ajuste del pH a 6.0, el cultivo fue pasado dos veces a través de un Microfluidizador M-210B-EH (Microfluidics, Newton, Mass.) a 1195 kg/cm² (17,000 psi). La homogeneización alta presión de las células liberó el Fab en el sobrenadante del cultivo.

10 El primer paso en la purificación fue cromatografía de afinidad de metal inmovilizado de lecho expandido (EB-IMAC). La resina quelante Streamline(TM) (Pharmacia, Piscataway, N.J.) fue cargada con 0.1 M NiCl₂ y luego fue expandida y equilibrada en 50 mM de acetato, 200 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0.01% NaN₃, regulador a pH 6.0 fluyendo en la dirección hacia arriba. Se usó una solución de reserva para traer al homogenado del cultivo hasta 10 mM de imidazol, después de lo cual fue diluido dos veces son más en regulador de equilibrio para reducir el contenido de sólidos húmedos a menos de 5% en peso. Luego fue cargado en la columna Streamline fluyendo hacia arriba a una velocidad superficial de 300 cm/hr. Los desechos celulares pasaron a través sin impedimento, pero el Fab fue capturado por medio de la interacción de alta afinidad entre el níquel y la etiqueta de hexahistidina en la cadena pesada de Fab. Después del lavado, el lecho expandido fue convertido a un lecho empacado y el Fab fue eluido con 20 mM de borato, 150 mM NaCl, 200 mM imidazol, 0.01% NaN₃, regulador a pH 8.0 fluyendo en la dirección hacia abajo.

20 El segundo paso en la purificación usó cromatografía de intercambio iónico (IEC). Resina Q Sepharose FastFlow (Pharmacia, Piscataway, N.J.) fue equilibrada en 20 mM de borato, 37.5 mM NaCl, 0.01% NaN₃, pH 8.0. La combinación de elución de Fab del paso EB-IMAC fue diluido cuatro veces en 20 mM de borato, 0.01% NaN₃, pH 8.0 y cargado sobre la columna IEC. Después del lavado, el Fab fue eluido con un gradiente de sal de 37.5-200 mM de NaCl. Las fracciones de la elución fueron embargadas en su pureza usando un sistema Xcell II(TM) SDS-PAGE (Novex, San Diego, Calif.) Antes de la combinación. Finalmente, el Fab combinado fue concentrado y diafiltrado en 20 mM borato, 150 mM NaCl, 0.01% NaN₃, regulador a pH 8.0 para almacenamiento. Esto fue logrado en un sistema Sartoclon Slice(TM) equipado con un casete 10,000 MWCO (Sartorius, Bohemia, N.Y.). Los rendimientos de la purificación final fueron típicamente 50%. La concentración del Fab purificado fue medida por absorbancia de UV a 280 nm, suponiendo una absorbancia de 1.6 para a 1 mg/ml de solución.

Ejemplo 3

Selección de anticuerpos para el antígeno de Cadherina-17 a partir de preparaciones de membrana de tumor

30 Los anticuerpos seleccionados en el Ejemplo 2 fueron posteriormente examinados contra preparaciones de membrana de tumor para aislar anticuerpos que preferencialmente se unen a la Cadherina-17 en células de cáncer y no al epitelio intestinal normal.

35 Las preparaciones de membrana del plasma biotiniladas de cáncer colorrectal apareado y muestras de tejido adyacente normal fueron usados para amplificar muestras de fago con un látex magnético de avidina para capturar al fago de anticuerpo unido a Cadherina-17 como se describió en el Ejemplo 2. Los anticuerpos fueron seleccionados de esas mezclas policlonales al examinar los anticuerpos que preferencialmente se unen Cadherina-17 en las células de cáncer colorrectal y no al epitelio intestinal normal. Luego estos anticuerpos fueron aislados como se describe en el Ejemplo 4 y analizados para la unión a Cadherina-17.

Ejemplo 4

40 Selección de anticuerpos monoclonales a Cadherina-17 a partir de mezclas de anticuerpo policlonal recombinante

45 Los anticuerpos monoclonales contra Cadherina-17 fueron aislados de clones que contenían las mezclas policlonales recombinantes (Ejemplo 3) al colocar en placas una muestra diluida de la mezcla en placas de agar LB que contenían 10 µg/ml de tetraciclina. Entonces, las colonias individuales fueron probadas por su capacidad de producir anticuerpos que reconocieron a Cadherina-17 recombinante usando resonancia de plasmón superficial (BIACORE) (BIACORE, Uppsala, Suecia). La producción a pequeña escala de estos anticuerpos monoclonales fue efectuada usando un método de unión por lotes a Ni-quelato (véase lo siguiente). Los anticuerpos aislados de este método fueron diluidos 1:3 en HBS-EP (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% polisorbato 20

(v/v)), capturados en un anticuerpo kapa cabra anti-ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, Ala.) Acoplados a un circuito integrado detector BIACORE CM5, y probados por su capacidad de unirse a Cadherina-17 recombinante.

Minipreparación de anticuerpos monoclonales por el método de unión por lotes a Ni-quelato

- 5 Las colonias individuales fueron aisladas de las mezclas policlonales recombinante es (Ejemplo 3) y se usaron para inocular 3 ml de cultivos de medio 2*YT que contenía 1% de glicerol suplementado con 10 µg/ml de tetraciclina. Estos cultivos fueron criados en un agitador incubado Innova 4330 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.) ajustado a 37 °C., 300 rpm. La siguiente mañana 0.5 ml de cada cultivo fue usado para inocular matraces agitados que contenían 50 ml de medio definido, (Pack et al. (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277) suplementado con 3 g/L L-leucina, 3 g/L L-isoleucina, 12 g/L digestión de caseína (Difco, Detroit, Mich.), 12.5 g/L glicerol y 10 µg/ml de tetraciclina. Estos cultivos fueron agitados a 300 rpm, 37 °C. hasta que se alcanzó una densidad óptica de 4 a 600 nm. Entonces fue inducida la expresión Fab añadiendo L(+)-arabinosa (Sigma, St. Louis, Mo.) a 2 g/L y cambiando la temperatura a 23 °C. con agitación durante la noche. El siguiente día se añadió lo siguiente a los cultivos de 50 ml: 0.55 ml de 1 M imidazol, 5 ml B-PER (Pierce, Rockford, Ill.) y 2 ml de resina de Ni-quelante (Chelating Sepharose FastFlow(TM) resin Pharmacia, Piscataway, N.J.). La mezcla fue agitada a 300 rpm, 23 °C. por 1 hora después de cuyo tiempo se detuvo la agitación y se dejó a la resina depositarse en el fondo de los matraces por 15 minutos.

- 20 Entonces fue vertido el sobrenadante y la resina resuspendida en 40 ml de BBS (20 mM borato, 150 mM NaCl, 0.1% NaN3, pH 8.0) que contenía 10 mM de imidazol. Esta suspensión fue transferida a un tubo cónico de 50 ml y la resina fue lavada un total de 3 veces con BBS que contenía 10 mM de imidazol. El lavado fue efectuado por centrifugación a baja velocidad (1100 rpm por 1 minuto), remoción del sobrenadante y, resuspensión de la resina en BBS que contenía 10 mM de imidazol. Después que se eliminó el sobrenadante del lavado final, se añadió, 0.5 ml de 1 M imidazol a cada tubo, se sometió a vórtice brevemente, y se transfirió a un tubo de microcentrifugación estéril. Las muestras fueron entonces centrifugadas a 14 krpm por 1 minuto y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de micro centrifugación. Los anticuerpos contenidos en el sobrenadante fueron entonces analizados para su unión a Cadherina-17 usando un BIACORE (BIACORE, Uppsala, Suecia).

Ejemplo 5

Especificidad de anticuerpos monoclonales a Cadherina-17 determinada por análisis de citometría de flujo

- 30 La especificidad de los anticuerpos contra Cadherina-17 seleccionada en el Ejemplo 4 fue probada por citometría de flujo. Para probar la capacidad de los anticuerpos para unirse a una proteína Cadherina-17 de superficie celular, los anticuerpos fueron incubados con células que expresan a Cadherina-17: LoVo y LS174T, líneas de cáncer colorrectal humano. Las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS. Se aplicaron cuatro microlitros de las suspensiones a pozos de un portaobjetos de microscopio de ocho pozos y se dejaron secar al aire. Los portaobjetos fueron ligeramente calentados para fijar los untados al portaobjeto y se cubrieron con 0.1 mg/ml de anticuerpo diluido en PBS que contenía 1% BSA. Los untados fueron incubados con anticuerpo por 1 h a 37 °C. En una cámara de humedad. Después del lavado de los portaobjetos tres veces por remojo en PBS por 5 min cada una, los untados fueron cubiertos con conjugado de fluoresceína isotiocianato de conejo anti-ratón IgG (H&L) F(ab')₂ (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, Calif.) diluido 1:80 en PBS, 1% BSA, 0.05% Azul de Evans (Sigma). Los portaobjetos fueron incubados por 1 h a 37 °C. en una Cámara de humedad que se lavó como se describió antes. Después de un lavado final con agua desionizada, los portaobjetos fueron secados al aire en la oscuridad. Se montaron cubre objetos usando un medio de montaje al 90% de glicerol que contenía 10 mg/ml p-fenilendiamina, pH 8.0.

- 45 Los resultados del análisis de citometría de flujo demostraron que 14 anticuerpos monoclonales PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 se unieron de manera efectiva a la Cadherina-17 humana de superficie celular.

Ejemplo 6

Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales a Cadherina-17

- 5 Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos monoclonales PTA001_A1, PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13 y PTA001_A14 fueron obtenidas usando técnicas estándar de PCR y fueron secuenciadas usando técnicas estándar de secuenciación de ADN.
- Las secuencias anticuerpo pueden ser mutagenizadas para revertir los residuos de la línea germinal a uno o más residuos.
- Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A1 se muestran en la Figura 1 y en las SEQ ID NO:59 y 35, respectivamente.
- 10 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A1 se muestran en la Figura 13 y en las SEQ ID NO:71 y 47, respectivamente.
- 15 La comparación de las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A1 a las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demostró que la cadena pesada de PTA001_A1 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino V_H 7-39. Un análisis posterior de la secuencia V_H de PTA001_A1 usando el sistema Kabat de determinación de región de CDR llegó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 1, y en las SEQ ID NOs:1, 5 y 14, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de PTA001_A1 CDR1 a la secuencia de la línea germinal V_H 7-39 se muestra en la Figura 25.
- 20 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A1 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A1 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 1-110. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A1 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 13 y en la SEQ ID NOs:22, 28 y 32, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1 y CDR3 de PTA001_A1 a la secuencia de la línea germinal V_K 1-110 se muestran en las Figuras 27 y 29, respectivamente.
- 25 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A2 se muestran en la Figura 2 y en la SEQ ID NO: 60 y 36, respectivamente.
- Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A2 se muestran en la Figura 14 y en la SEQ ID NO: 72 y 48, respectivamente.
- 30 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A2 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A2 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino V_H VH105 y Gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A2 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 2 y en la SEQ ID NOs:2, 6 y 15, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_H de CDR1 de PTA001_A2 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A2 a la región de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.
- 35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A2 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A2 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A2 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 14 y en la SEQ ID NOs:23, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1 y CDR3 de PTA001_A2 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.
- 40 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A3 se muestran en la Figura 3 y en la SEQ ID NO: 61 y 37, respectivamente.
- 45

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A3 se muestran en la Figura 14 y en la SEQ ID NO: 72 y 48, respectivamente.

5 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A3 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A3 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A3 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 3 y en la SEQ ID NOs:3, 7 y 16, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A3 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A3 a la región de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A3 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A3 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A3 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 14 y en la SEQ ID NOs:23, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A3 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A4 se muestran en la Figura 4 y en la SEQ ID NO: 62 y 38, respectivamente.

20 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A4 se muestran en la Figura 15 y en la SEQ ID NO: 73 y 49, respectivamente.

25 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A4 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A4 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A4 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 4 y en la SEQ ID NOs:4, 8 y 17, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A4 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A4 a la región de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

30 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A4 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A4 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 8-30. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A4 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 15 y en la SEQ ID NOs:24, 30 y 34, respectivamente.

35 Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A4 a la secuencia de la línea germinal V_K 8-30 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A5 se muestran en la Figura 5 y en la SEQ ID NO: 63 y 39, respectivamente.

40 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A5 se muestran en la Figura 16 y en la SEQ ID NO: 74 y 50, respectivamente.

45 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A5 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A5 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A5 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 5 y en la SEQ ID NOs:3, 7 y 18, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A5 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H

de CDR2 de PTA001_A5 a la región de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

5 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A5 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A5 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A5 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 16 y en la SEQ ID NOs:25, 31 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A5 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

10 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A6 se muestran en la Figura 6 y en la SEQ ID NO: 64 y 40, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A6 se muestran en la Figura 17 y en la SEQ ID NO: 75 y 51, respectivamente.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A6 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A6 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A6 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 6 y en la SEQ ID NOs:3, 7 y 16, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A6 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A6 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

20 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A6 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A6 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A6 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 17 y en la SEQ ID NOs:23, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A6 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A7 se muestran en la Figura 7 y en la SEQ ID NO: 65 y 41, respectivamente.

30 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A7 se muestran en la Figura 18 y en la SEQ ID NO: 76 y 52, respectivamente.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A7 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A7 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 7 y en la SEQ ID NOs:3, 9 y 19, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A7 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A7 a la región de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

40 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A7 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A7 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A7 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 18 y en la SEQ ID NOs:26, 29 y 33, respectivamente.

45 Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A7 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A8 se muestran en la Figura 8 y en la SEQ ID NO: 66 y 42, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A8 se muestran en la Figura 19 y en la SEQ ID NO: 77 y 53, respectivamente.

5 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A8 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A8 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A8 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 8 y en la SEQ ID NOs:3, 7 y 16, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A8 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A8 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A8 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A8 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A8 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 19 y en la SEQ ID NOs:23, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A8 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

20 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A9 se muestran en la Figura 6 y en la SEQ ID NO: 64 y 40, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A9 se muestran en la Figura 20 y en la SEQ ID NO: 78 y 54, respectivamente.

25 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A9 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A9 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A9 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 6 y en la SEQ ID NOs:3, 7 y 16, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A9 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A9 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A9 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A9 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A9 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 20 y en la SEQ ID NOs:23, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A9 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

40 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A10 se muestran en la Figura 6 y en la SEQ ID NO: 64 y 40, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A10 se muestran en la Figura 21 y en la SEQ ID NO: 79 y 55, respectivamente.

45 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A10 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A10 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A10 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR

condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 6 y en la SEQ ID NOs:3, 7 y 16, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A10 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A10 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

- 5 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A10 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A10 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A10 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 19 y en la SEQ ID NOs:25, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A10 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A11 se muestran en la Figura 9 y en la SEQ ID NO: 67 y 43, respectivamente.

- 15 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A11 se muestran en la Figura 22 y en la SEQ ID NO: 80 y 56, respectivamente.

- 20 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A11 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A11 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A11 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 9 y en la SEQ ID NOs:3, 10 y 20, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A11 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A11 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

- 25 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A11 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A11 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A11 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 22 y en la SEQ ID NOs:27, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A11 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A12 se muestran en la Figura 10 y en la SEQ ID NO: 68 y 44, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A12 se muestran en la Figura 21 y en la SEQ ID NO: 81 y 55, respectivamente.

- 35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A12 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A12 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A12 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 10 y en la SEQ ID NOs:3, 11 y 21, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A12 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A12 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

- 45 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A12 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A12 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A12 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 21 y en la SEQ ID NOs:25, 29 y 33,

respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A12 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A13 se muestran en la Figura 11 y en la SEQ ID NO: 69 y 45, respectivamente.

- 5 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A13 se muestran en la Figura 23 y en la SEQ ID NO: 82 y 57, respectivamente.

- 10 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A13 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A13 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A13 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 11 y en la SEQ ID NOs:3, 12 y 18, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A13 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A13 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

- 15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A13 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A13 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A13 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 23 y en la SEQ ID NOs:25, 31 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A13 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de PTA001_A14 se muestran en la Figura 12 y en la SEQ ID NO: 70 y 46, respectivamente.

- 25 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de PTA001_A14 se muestran en la Figura 24 y en la SEQ ID NO: 83 y 58, respectivamente.

- 30 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de PTA001_A14 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena pesada de PTA001_A14 utiliza un segmento V_H de la línea germinal de murino VH105 de región V_H II y gen H17 V_H II. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A14 V_H usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en la Figura 12 y en la SEQ ID NOs:2, 13 y 15, respectivamente. La alineación de la secuencia V_H de CDR1 de PTA001_A14 a la secuencia de la línea germinal del gen H17 V_H II se muestran en la Figura 25, y la alineación de la secuencia de V_H de CDR2 de PTA001_A14 a la región VH105 de la línea germinal V_H II se muestra en Figura 26.

- 35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de PTA001_A14 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal de murino conocida demuestra que la cadena ligera de PTA001_A14 utiliza un segmento V_K de la línea germinal de murino V_K 24-140. Un análisis posterior de la secuencia PTA001_A14 V_K usando el sistema Kabat de determinación de la región de CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en la Figura 24 y en la SEQ ID NOs:23, 29 y 33, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 de PTA001_A14 a la secuencia de la línea germinal V_K 24-140 se muestran en las Figuras 27, 28 y 29, respectivamente.

Ejemplo 7

Inmunohistoquímica en las secciones FFPE usando anticuerpos anti-Cadherina-17

La inmunohistoquímica fue realizada en secciones FFPE de tejido de tumor colorrectal y adyacente normal usando los anticuerpos PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A6, PTA001_A8 y PTA001_A9.

ES 2 574 236 T3

El EX-De-Wax fue de BioGenex, CA, USA. Las secciones y arreglos de tejido fueron de Biomax, MD, USA.

5 Los portaobjetos fueron calentados por 2 h a 60 °C en 50 ml de Falcons en un baño de agua sin regulador. Cada Falcon tuvo un portaobjetos o dos portaobjetos espalda con espalda con una punta de carga de gel larga entre ellos para prevenir que los portaobjetos se pegaran uno al otro. Los portaobjetos fueron desparafinizados en EZ-DeWax por 5 min en una mampara de deslizamiento negras, luego se encontraron bien con la misma solución de DeWax usando una pipeta de 1 ml, luego se lavó con agua de la botella de agua. Los portaobjetos fueron colocados en una jarra coplin llena con agua hasta que estuvo lista la presión de la olla; el agua fue cambiada un par de veces.

10 El agua fue intercambiada por solución de recuperación de antígeno = 1 x regulador de citrato, pH 6 (DAKO). El antígeno fue recuperado por el método de olla a presión. Los porta objetos en la jarra coplin de plástico en solución de recuperación de antígeno fueron colocados en una olla a presión que luego fue calentada hasta la posición 6 (el máximo ajuste). 15-20 min dentro de la incubación, la temperatura fue reducida a la posición 3 y se dejó a esa (cuando la temperatura al interior de la olla de presión fue 117 °C) por otros 20-25 minutos. Luego la pericia fue apagada y la fue colocada sobre la perilla fría y se liberó la presión al mover cuidadosamente el mango a la posición entre "abierto" y "cerrado". El sistema completo se dejó liberar la presión y enfriar por otros 20 minutos. Se abrió la
15 tapa y se sacaron las muestras para reposo en la mesa. Los portaobjetos fueron lavados 1x5min con PBS-3T (0.5 L PBS + 3 gotas de Tween-20) y colocados en PBS.

20 Después de la recuperación del antígeno, los portaobjetos fueron montados en el sistema Shandon Coverplate. Se previno que quedaron atrapadas con hojas de aire entre el portaobjetos y el cubre objetos de plástico para colocar al cubre objetos dentro de la jarra coplin llena con PBS y se deslizaron suavemente los portaobjetos con las secciones de tejido dentro del cubre objetos. Se jaló hacia afuera el portaobjetos de la jarra coplin mientras que se sujetaba fuertemente junto con el cubre objetos. El portaobjetos ensamblado fue colocado en el soporte, dejando que el PBS atrapado en el embudo y entre el portaobjetos cubre objetos se escapara. Los portaobjetos fueron lavados con 2x2 ml (or 4x1 ml) PBS-3T, 1x2 ml PBS, esperando a que se eliminara todo el PBS a través del portaobjetos y que no quedara virtualmente nada de PBS en el embudo.

25 Se realizó un bloqueo de peróxido endógeno usando 1-4 gotas de solución de peróxido por portaobjetos; el tiempo de incubación fue de 5 minutos. Los portaobjetos fueron encuadrados con agua y luego una vez con 2 ml PBS; fue importante esperar hasta que virtualmente no quedó líquido en el embudo antes de añadir una nueva porción del regulador de lavado.

30 El anticuerpo primario diluido con un reactivo diluyente de anticuerpos (DAKO). La dilución óptima fue determinada siendo 1:400. Se aplicó hasta 200 µl del anticuerpo primario diluido a cada portaobjetos y se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados con 2x2 ml (o 4x1 ml) PBS-3T y luego 1x2 ml PBS.

Se aplicó secundario cabra anti-ratón kapa HRP (1 mg/ml, cat.1050-05, Southern Biotech) a 2x2 gotas por cubre objetos y se incubó por 35 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados como en lo anterior.

35 El sustrato DAB fue formado en regulador de dilución; 2 ml que contenían 2 gotas de sustrato fue suficiente para los 10 portaobjetos. El reactivo DAB fue aplicado a los portaobjetos al aplicar unas cuantas gotas en un momento y dejando por 10 min. Los portaobjetos fueron lavados 1x2 ml (o 2x1 ml) con PBS-3T y 1x2 ml (o 2x1 ml) con PBS.

40 Se aplicó hematoxilina (DAKO); 1 ml fue suficiente para 10 portaobjetos y los portaobjetos fueron inculcados por 1 min a temperatura ambiente. Los embudos del sistema Shandon Coverplate fueron llenados con 2 ml de agua y se dejó correr a través de ellos. Cuando los portaobjetos estuvieron libres el exceso de hematoxilina, el sistema fue que se ensamblado, las secciones y/o arreglos de tejido fueron lavadas con agua de la botella de agua y colocadas dentro de un soporte de portaobjetos negro. Los tejidos fueron deshidratados al incubar en EZ-DeWax por 5 min y y luego en 95% de etanol por 2-5 min.

Los portaobjetos fueron dejados secar en una mesa a temperatura ambiente y luego se montaron en un medio de montaje se cubrieron con cubre objetos.

45 El análisis inmunohistoquímico en los anticuerpos PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A6, PTA001_A8 y PTA001_A9 reveló una tinción específica de membrana de células de tumor en cáncer colorrectal y ninguna tinción

apreciable del tejido adyacente normal en todos los casos. El anticuerpo PTA001_A4, en particular, mostró una tinción clara específica de membrana de las células de tumor.

EJEMPLO 8

Inmunohistoquímica en secciones congeladas usando anticuerpos anti-Cadherina-17

- 5 Se realizó inmunohistoquímica en tejidos apareados de tumor y adyacentes normales congelados usando los anticuerpos anti-Cadherina-17 PTA001_A4, PTA001_A6, PTA001_A8 y PTA001_A9.

Las secciones de tejido fueron de BioCadena Institute Inc., CA, USA.

Las secciones congeladas fueron lavadas con PBS dos veces por 3 minutos cada vez y luego fueron colocadas en PBS.

- 10 Se realizó bloqueo de peróxido endógeno usando Bloqueador de Peroxidasa (S2001, DAKO). Se añadieron 1-4 gotas del bloqueador de peroxidasa a cada portaobjetos y se incubó por 5 minutos. Los objetos fueron encuadrados tres veces con 3 ml de PBS.

- 15 El anticuerpo primario fue diluido con un reactivo diluyente de anticuerpos (DAKO). 150 µl de anticuerpo primario diluido fue aplicado a cada portaobjetos e incubado por 45 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados dos veces por 3 minutos con PBS-3T (500 ml PBS + 3 gotas de Tween-20) y luego una vez por 3 minutos con PBS.

Se aplicó secundario cabra anti-ratón kapa HRP a 1:1000 (1 mg/ml, cat.1050-05, Southern Biotech) y se incubó por 35 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados como en lo anterior.

- 20 El sustrato DAB fue formado en regulador de dilución; 2 ml que contenían 2 gotas de sustrato fue suficiente para los 10 portaobjetos. El reactivo DAB fue aplicado a los portaobjetos al aplicar unas cuantas gotas en un momento y dejando por 10 min. Los portaobjetos fueron lavados una vez por 3 minutos con PBS-3T y dos veces por 3 minutos con agua.

Se aplicó hematoxilina (DAKO); 1 ml fue suficiente para 10 portaobjetos y los portaobjetos fueron inculcados por 1 min a temperatura ambiente.

- 25 Los portaobjetos fueron dejados secar en una mesa a temperatura ambiente y luego se montaron en un medio de montaje basado en agua de Vector y se cubrieron con cubre objetos.

- 30 El análisis inmunohistoquímico en los anticuerpos PTA001_A4, PTA001_A6, PTA001_A8 y PTA001_A9 en tres muestras de cáncer colorrectal junto con las muestras de tejido adyacente normal a pareadas revelaron una fuerte tinción específica de membrana de las células de tumor en el cáncer colorrectal y una tinción débil del tejido adyacente normal. El anticuerpo PTA001_A4, en particular, mostró una tinción clara específica de membrana de las células de tumor.

Ejemplo 9

Transferencia Western usando anticuerpos anti-Cadherina-17

- 35 La transferencia Western fue realizada usando anticuerpos anti-Cadherina-17 PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A6, PTA001_A8 y PTA001_A9 para detectar a Cadherina-17 en un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal genéticamente caracterizadas representando combinaciones de tres fenotipos de mutación crítica (p53, APC y RER+).

- 40 Perlas celulares congeladas súbitamente fueron lisadas en regulador RIPA modificado (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxicolato, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) que contenían inhibidores de proteasa (Roche) y y se aclaró al girar a 18,000 g por 15 min a 4 C. en regulador de carga de muestra 4x LDS (Invitrogen Inc.) fue añadido al

lisado clarificado a una concentración final de 1x; la muestra fue calentada por 10 min a 70 °C y mantenida a -80 °C posteriormente. Antes se cargar en gel las muestras fueron recalentadas.

5 Las proteínas de 10 µg (PC/JW) y 20 µg (otras líneas de células) de lisado por banda fueron separadas por electroforesis de mini-gel en mini-gel profundido NuPAGE Novex (Invitrogen, UK). Los g fueron transferidos sobre membrana de nitrocelulosa con un Sistema iBlot Dry Blotting (Invitrogen, UK).

La membrana fue incubada con bloqueador libre de animal (Vector) y probada con anticuerpo anti-Cadherina-17 en un bloqueador libre de animal a una dilución de 1:500, a 4 C, por 14-18 h, con rotación. El secundario fue el conjugado anti-ratón DyLight 488 (Pierce).

10 Se detectó una señal clara a un tamaño correspondiente a la proteína Cadherina-17 (92 kDa) en 11 de las 14 líneas de células colorrectales elegidas para todos los 5 anticuerpos de 5 Cadherina-17 (PTA001_A3, PTA001_A4, PTA001_A6, PTA001_A8 y PTA001_A9). La Figura 25 muestra el análisis de transferencia Western de Cadherina-17 para el anticuerpo PTA001_A4. Las líneas de células fueron cuidadosamente seleccionadas para diferentes antecedentes genéticos relevantes para el inicio y progresión de CRC (RER+ = fenotipo de tumor positivo de error de replicación; RER- = fenotipo de tumor deficiente de error de replicación; p53 del tipo silvestre o ante y APC del tipo silvestre o genotipo mutante. El Cuadro 2 siguiente muestra el fenotipo de las líneas celulares derivadas del tumor colorrectal.

15

Tabla 2 - Fenotipo de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales

Línea celular	Características
LS411	Carcinoma Colorrectal, etapa del Tumor: tipo B de Dukes; Tumorigénico en ratones desnudos.
LoVo	Adenocarcinoma Colorrectal, tipo C de Dukes, grado IV derivado del sitio metastásico; Tumorigénico en ratones desnudos.
Vaco 5	Carcinoma Colorrectal.
DLD-1	Adenocarcinoma Colorrectal, tipo C de Dukes; Tumorigénico en ratones desnudos.
LS 174T	Adenocarcinoma Colorrectal, tipo B de Dukes; Tumorigénico en ratones desnudos.
HCT 116	Colorrectal carcinoma, Tumorigénico en ratones desnudos.
PC/JW	Adenocarcinoma. Tumorigénico en ratones desnudos étlicos.
C99	Adenocarcinoma Colorrectal
C84	Adenocarcinoma Colorrectal
HT29	Adenocarcinoma Colorrectal Tumorigénico en ratones desnudos.
LS513	Adenocarcinoma Colorrectal, tipo C de Dukes; Tumorigénico en ratones desnudos.
NCI-H716	Adenocarcinoma Colorrectal Tumorigénico en ratones desnudos..
Caco2	Adenocarcinoma Colorrectal
Colo205	Adenocarcinoma Colorrectal

Ejemplo 10

20 Internalización de Anticuerpos anti-Cadherina-17

El PTA001_A4 mostró ser internalizado por células LoVo células con la unión a las células usando un ensayo microscópico de inmunofluorescencia. El ensayo microscópico de inmunofluorescencia mostró la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-Cadherina-17 a través de la unión de un conjugado de anticuerpo secundario IgG anti-humano a Fluoresceína isotiocianato (GamK-FITC). Primero, los PTA001_A4 fueron unidos a la superficie de células LoVo. Luego, el conjugado de anticuerpo secundario a Fluoresceína isotiocianato fueron unidos a los anticuerpos primarios. Enseguida, el complejo de conjugado FITC PTA001_A4/anticuerpo secundario o internalizado por las células.

25

5 El ensayo de microscopia de inmunofluorescencia fue realizado como sigue: células LoVo fueron incubadas a 37°C por 12 horas para que las células se adhirieran entre sí. El PTA001_A4 y el conjugado de anticuerpo secundario a Fluoresceína isotiocianato fueron diluidos serialmente, lavados con regulador FACS (PBS, 2% FBS) y y luego añadidos el medio de cultivo. Luego el medio fue lavado del nuevo con regulador FACS (PBS, 2% FBS) e incubado al 37%, después de lo cual se añadió 200 ul 2% de PFA. Los cubre objetos fueron montados usando 9 ul de un medio de montaje acuoso y luego las células fueron visualizadas a intervalos regulares de tiempo usando un microscopio fluorescente Leica. La Figura 32A y la Figura 32B muestran la superficie de unión de PTA001_A4/complejo de conjugado FITC anticuerpo secundario a células LoVo después de 60 minutos de incubación e internalización de PTA001_A4/complejo de conjugado FITC anticuerpo secundario después de 120 minutos.

15 El anticuerpo monoclonal PTA001_A4, demostró ser internalizado por células LS147T y LoVo con la unión de las células usando un ensayo MabZap. El ensayo MabZAP mostró la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-CDH17 a través de la unión de un anticuerpo secundario de IgG anti-humano conjugado a la toxina saporina. (Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100). Primero, el PTA001_A4 fue unido a la superficie de las células LS147T y LoVo. Luego, los anticuerpos MabZAP fueron unidos a los anticuerpos primarios. Enseguida, el complejo MabZAP fue internalizado por las células. La entrada de Saporina dentro de las células resultó en la inhibición de la síntesis de proteínas y eventual muerte celular.

20 El ensayo MabZAP fue realizado como sigue. Cada una de las células fue sembrada a una densidad de 5×10^3 células por pozo. Los anticuerpos monoclonales anti-CDH17 o un piso tipo de control de IgG humano fueron serialmente diluidos luego añadidos a las células. Luego fue añadido el MabZAP a una concentración de 50 µg/ml y las placas se dejaron incubar por 48 y 72 horas. Se detectó la viabilidad de las células en las placas mediante un Kit de Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CélulaTiter-Glo® (Promega, G7571) y las placas fueron leídas a 490nM por un Luminomitor (Tuner BioSystems, Sunnyvale, CA). Los datos fueron analizados por Prism (Graphpad). La muerte celular fue proporcional a la concentración de PTA001_A4 y anticuerpo monoclonal. Las Figuras 35A y 35B muestran que los anticuerpos monoclonales anti-CDH17 fueron eficazmente internalizados por las células LS147T y LoVo respectivamente en comparación con el anticuerpo de control del isotipo IgG anti-humano.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO	DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA	SECUENCIA
1	VH CDR1 aminoácido PTA001 A1	GFTFSNYGMS
2	VH CDR1 aminoácido PTA001 A2,PTA001 A14	GYTFSDHAIH
3	VH CDR1 aminoácido PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001 A12, PTA001 A13	GYTFTDHAIH
4	VH CDR1 aminoácido PTA001 A4	GYTLTDHTIH

ES 2 574 236 T3

5	VH CDR2 aminoácido PTA001 A1	AINRDGGTTYTDNVKG
6	VH CDR2 aminoácido PTA001 A2	YIYPRHGTTNYNENFKG
7	VH CDR2 aminoácido PTA001 A3,PTA001 A5, PTA001_A6, PTA001_A8, PTA001 A9,PTA001 A10	YIYPEHGTIKYNEKFKG
8	VH CDR2 aminoácido PTA001 A4	YIYPRDGITGYNEKFKG
9	VH CDR2 aminoácido PTA001 A7	YIYPRDGFTKYNEKFKG
10	VH CDR2 aminoácido PTA001 A11	YIYPEHGSITYNEKFKG
11	VH CDR2 aminoácido PTA001 A12	YIYPRDDFAKVNEKFKG
12	VH CDR2 aminoácido PTA001 A13	YIYPEHGTITYNEKFKG
13	VH CDR2 aminoácido PTA001 A14	YIFPRDAFSLNNEKFKG
14	VH CDR3 aminoácido PTA001 A1	FLLWDGWYFDV
15	VH CDR3 aminoácido PTA001 A2,PTA001 A14	RNYFYVMDY
16	VH CDR3 aminoácido PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001 A10	TNYFYVMEY
17	VH CDR3 aminoácido PTA001 A4	GYSYRNYAYYYDY
18	VH CDR3 aminoácido PTA001 A5,PTA001 A13	RNYLYIMDY
19	VH CDR3 aminoácido PTA001 A7	TNYFYTMDY

ES 2 574 236 T3

20	VH CDR3 aminoácido PTA001 A11	RNYLYVMDY
21	VH CDR3 aminoácido PTA001 A12	TNYLYIMDY
22	VK CDR1 aminoácido PTA001 A1	RSSQSLHNSGNTYLH
23	VK CDR1 aminoácido PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001 A14	TSSKSLRSNGNTYLY
24	VK CDR1 aminoácido PTA001 A4	KSSQSLHSSNQKNYLA
25	VK CDR1 aminoácido PTA001_A5, PTA001_A8, PTA001_A10, PTA001_A12, PTA001 A13	RSSKSLRSNGNTYLY
26	VK CDR1 aminoácido PTA001 A7	RSSKSLRTNGNTYLH
27	VK CDR1 aminoácido PTA001 A11	RSTKSLRSNGNTYLY
28	VK CDR2 aminoácido PTA001_A1	KVSNRFS
29	VK CDR2 aminoácido PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001 A14	RMSNLAS
30	VK CDR2 aminoácido PTA001 A4	WASTRES
31	VK CDR2 aminoácido PTA001_A5, PTA001_A8, PTA001_A13	RLSNLAS

32	VK CDR3 aminoácido PTA001_A1	SQSTHVLVLT
33	VK CDR3 aminoácido PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13, PTA001_A14	MQHLEYPFT
34	VK CDR3 aminoácido PTA001_A4	QQYYSYPWT
35	VH aminoácido PTA001_A1	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAEVQLLETGGGVVVKPG GSLKLSCAASGFSTFSNYGMSWVRQTPEKRLEWVAAINRDGGTTYTDNVKGG RFTISRDNKNSLYLQMSLSRSEDALYYCARQFLLWDGWYFDVWGAGTTV TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC
36	VH aminoácido PTA001_A2	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDAELVKPG ASVKISCKVSGYTFSDHAIHWMSQRPGQGLKWIGYIYPRHGTTNYNENFKGK ATLTADTSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARMRNYFYVMDYWGQGTSTVVS SAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF TPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC
37	VH aminoácido PTA001_A3	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVLLQQSDAELVKPG ASVKISCKASGYTFDTHAIHWVKQRPEQGLEWIGYIYPEHGTIKYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCRSLTNYFYVMEYWGQGTSTVSSA KTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC
38	VH aminoácido PTA001_A4	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAEVQLQQSDAELVKPG ASVKMSCKVSGYTLTDHTIHWKQRPEQGLEWIGYIYPRDGITGYNEKFKGK ATLTADTSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARWGYSYRNYAYYDYWGQGT TLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPR DC
39	VH aminoácido PTA001_A5	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDADLVKPG ASVKISCKASGYTFDTHAIHWVKQRPEQGLEWIGYIYPEHGTIKYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARLRNYLYIMDYWGQGTSTVSSA KTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC
40	VH aminoácido PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001_A10	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDAELVKPG ASVKISCKASGYTFDTHAIHWVKQRPEQGLEWIGYIYPRDGFYKYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCRSLTNYFYVMEYWGQGTSTVSSA KTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC
41	VH aminoácido PTA001_A7	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDAELVKPG ASVKISCKVSGYTFDTHAIHWKQRPEQGLEWIGYIYPRDGFYKYNEKFKGK ATLTADTSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARMTNYFYVMDYWGQGTSTVVS SAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC
42	VH aminoácido PTA001_A8	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDADLVKPG ASVKISCKASGYTFDTHAIHWVKQRPEQGLEWIGYIYPEHGTIKYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCRSLTNYFYVMEYWGQGTSTVSSA KTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC
43	VH aminoácido PTA001_A11	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDAELVKPG ASVKISCKASGYTFDTHAIHWVKQRPEQGLEWIGYIYPEHGSITYNEKFKGKA TLTADKSSSTVYMHLSLTSEDSAVYFCARLRNYLYVMDYWGQGTSTVSS AKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKKIVPRDC

ES 2 574 236 T3

44	VH aminoácido PTA001_A12	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSEAELVKPG ASVKLSCKASGYTFDTHAIHWKQRPEQGLEWIGYIYPRDDFAKVNKFKG KATLTADTSSSTAQMQLNSLTSEDSAVYFCARMTNYLYIMDYWGQGTSTVTV SSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKIKIVPRDC
45	VH aminoácido PTA001_A13	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDAEVLKPG ASVKISCKASGYTFDTHAIHWKQRPEQGLEWIGYIYPEHGITYNEKFKGKA TLTADKSSSTVYMHLSLTSEDSAVYFCARLRNYLYIMDYWGQGTSTVTVSSA KTTTPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKIKIVPRDC
46	VH aminoácido PTA001_A14	LGKPWRYPRFVHGENKVKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSDAALVKPG ASVKISCKVSGYTFSDHAIHWKQRPEQGLEWIGYIFPRDAFSLNNEKFKGK ATLSADTSSSTA YMELTSLTFEDSAVYFCARMRNYFYVMDYWGQGTSTVTVS SAKTTPPSVYTLAPGSAQAQTNMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVH TFP AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKIKIVPRDC
47	VK aminoácido PTA001_A1	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADVLT QTPLSLPVTLDGQASISCRSSQSLHNSGNTYLHWYLLKPGQSPKLLIYKVS RFSGVDRFSGSGSGTDFTLKTRVEAEDLVYFCSQSTHVLTFGAGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
48	VK aminoácido PTA001_A2, PTA001_A3	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNL ASGVDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
49	VK aminoácido PTA001_A4	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMS QSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQSLHSSNQKNYLAWYQKPGQSPKVLIIYWA STRESGVDRFTGSGSGTDFTLTITSVKSEDLAVYYCQYYSYPWTFGGGTRL EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNG VLNSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR NESYPYDVPDYAS
50	VK aminoácido PTA001_A5	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNL ASGVDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
51	VK aminoácido PTA001_A6	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETIKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMTQ AAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLA SGVDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGSGTKLEIKR ADAAPTVSILPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNES YPYDVPDYAS
52	VK aminoácido PTA001_A7	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRTNGNTYLHWFLQRPQSPQLLIYRMSNL ASGVDRFSGSGSGTAVTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
53	VK aminoácido PTA001_A8	RILPYAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNL ASGVDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
54	VK aminoácido PTA001_A9	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNL ASGVDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGSGTKLEIK RADAAPTVSISPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
55	VK aminoácido PTA001_A10, PTA001_A12	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNL ASGVDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGGGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
56	VK aminoácido PTA001_A11	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLRSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNL ASGVDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGGGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKSDSTYSMSSLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS

57	VK aminoácido PTA001_A13	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSPVPTPGESVVISCRSSKSLLRNSGNTYLYWFLQRPQSPQLLYRLSNL ASGVDPDRFSGSGSFTAFLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPPFTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFPQYSEQLTTGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVL NSWTDQDSKDYSSMSTLTLTKDEYERHNSYTCETHKSTSPIVKSFNRNE SYPYDVPDYAS
58	VK aminoácido PTA001_A14	RILPDAFYRNSLLFLHTRFFGWSETMKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMT QAAPSPVPTPGESVVISCTSSKSLLRNSGNTYLYWFLQRPQSPQLLYRMSNL ASGVDPDRFSGSGSFTAFLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPPFTFGSGTNLEIK RADAAPTVSIFTTTSREQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVK
59	VH n.t. PTA001_A1	TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCGAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGGGGGAGGCGTAGTG AAGCCCGGAGGGTCCCTTAAACTCTCTGTGACGCTCTGGATTCACTTTC AGTAACTATGGCATGTCTTGGGTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGA GTGGGTGCGCAGCCATTAATCGTGATGGTGGTACCACCTACTATACAGACA ATGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTG TACCTGCAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTG TGCAAGACAGTTCCTTCTCTGGGACGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGC AGGGACCACGGTACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCT ATCCACTGGCCCTGGATCTGTGCCAAAACCTAACTCCATGGTGACCTGG GATGCTGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAAC TCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCCTGAGCT GACCTTACTACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCC AGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGT GGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGT
60	VH n.t. PTA001_A2	TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCAGGTTCACTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGA AACCTGGAGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGTTCTGGCTACACCTTCA GTGACCATGTATTACTGGATGAGTCAGAGACCTGGACAGGGCCTGAAA TGGATTGGATATATTTATCCTAGACATGGGACTACTAACTACAATGAGAA CTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACAGCCT ACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAAGATTCTGCCGTCTATTCTGTG CAAGAATGAGAACTACTTCTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC TCAGTACCCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTG GCCCTGGATCTGTGCCAAAACCTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCTGTG GTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCC CCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCCTGAGCTGTACCTCTA CACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGA CCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAG AAAATTGTGCCAGGGATTGT
61	VH n.t. PTA001_A3	TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCAGGTTCTGTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGA AACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGTATTACTGGGTGAAGCAGAGGCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTATCCTGAACATGGAATTAAGTATAATGAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAATCCTCCAGCACCTGCT ATATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTGAGCAGTGTATTTCTGTT CAAGACTCACTAACTACTTCTATGTTATGGAGTATTGGGGTCAAGGAACCT CAGTACCCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGG CCCCTGGATCTGTGCCAAAACCTAACTCCATGGTGACCTGGGATGCTGTG TCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTAC ACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGAC CGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGA AAATTGTGCCAGGGATTGT
62	VH n.t. PTA001_A4	TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCGAGGTTCACTGCAACAGTCTGTCGCTGAGTTGGTGA AACCTGGAGCTTCAGTGAAGATGTCATGCAAGGTTTCTGGCTACACCCCTC ACTGACCATACTATTCACTGGATGAAGCAGAGGCTGAACAGGGCCTGGA ATGGATTGGATATATTTACCCTAGAGATGGAATAACTGGGTACAATGAGA AGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACTTCTCCAGCACAGCC TACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTTCTGT GCCAGATGGGGCTATAGTTACAGGAATTACCGCTACTACTATGACTACTG GGGCAAGGCACCACTCTCAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCAT CTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGTGCCAAAACCTAACTCCATGGTGA CCCTGGGATGCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGAC TGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTG CAGTCTGACCTTACTACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCAC TGGCCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCAC CAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGT

ES 2 574 236 T3

63	VH n.t. PTA001_A5	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCCAGGTTCAAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA AACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTATCCTGAACATGGAATTAAGTATAATGAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAAATCCTCCAGCACTGCCT ATATGCAGTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTACAGCAGTGATTTCTGTT CAAGACTCAGGAACTATTGTATATATGACTACTGGGGTCAAGGAACC TCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTG GCCCTGGATCTGTGCCAAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTG GTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATC CCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAAGTCTGACCTCTA CACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGA CCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAG AAAATTGTGCCAGGGATTGT
64	VH n.t. PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001_A10	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCCAGGTTCAAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA AACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTATCCTGAACATGGAATTAAGTATAATGAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAAATCCTCCAGCACTGCCT ATATGCAGTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTACAGCAGTGATTTCTGTT CAAGACTCACTAACTACTTCTATGTTATGGAGTATTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGG CCCCTGGATCTGTGCCAAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGG TCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAAGTCTGACCTCTAC ACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGAC CGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGA AAATTGTGCCAGGGATTGT
65	VH n.t. PTA001_A7	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCCAGGTTCAAGTGAAGATATCCTGCAAGGTTTCTGGCTACACCTTCA AACCTGGAGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGTTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGATGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTATCCTAGAGATGGTTTTACTAAGTACAATGAGAAG TTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACATCTCCAGCACAGCCTA CATGCAGTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTCTACAGTCTATTTCTGTGC AAGAAATGACTAACTACTTCTATACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGG CCCCTGGATCTGTGCCAAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGG TCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAAGTCTGACCTCTAC ACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGAC CGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGA AAATTGTGCCAGGGATTGT
66	VH n.t. PTA001_A8	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAGCCCAGGTTCAAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA AACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTATCCTGAACATGGAATTAAGTATAATGAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAAATCCTCCAGCACTGCCT ATATGCAGTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTACAGCAGTGATTTCTGTT CAAGACTCACTAACTACTTCTATGTTATGGAGTATTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGG CCCCTGGATCTGTGCCAAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGG TCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAAGTCTGACCTCTAC ACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGAC CGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGA AAATTGTGCCAGGGATTGT

ES 2 574 236 T3

67	VH n.t. PTA001_A11	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAAGCCAGGTTTCAGCTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGA AACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTTACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTATCCTGAACATGGTACTATTACGTATAATGAGAAG TTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAAATCCTCCAGTACTGTCTA TATGCACCTCAATAGCCTGACATCTGAGGATTTCAGCAGTGTATTTCTGTGC AAGACTCAGGAACACTTGTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCAAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGG CCCCGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGG TCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTAC ACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGAC CGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGA AAATTGTGCCAGGGATTGT
68	VH n.t. PTA001_A12	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAAGCCAGGTTTCAGCTGCAACAGTCTGAGGCTGAGCTTGTGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTTACTGGATGAAACAGAGGCCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATCTACCCAGAGATGATTTTGCTAAGGTGAATGAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACAGCAGACACATCCTCCAGCACAGCCT ACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTCTGTG CAAGAATGACTAACTACCTCTATATTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC TCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG GCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTG GTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATC CCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTA CACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGA CCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAG AAAATTGTGCCAGGGATTGT
69	VH n.t. PTA001_A13	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAAGCCAGGTTTCAGCTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGA AACCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTTACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTATCCTGAACATGGTACTATTACGTATAATGAGAAG TTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAAATCCTCCAGTACTGTCTA TATGCACCTCAATAGCCTGACATCTGAGGATTTCAGCAGTGTATTTCTGTGC AAGACTCAGGAACACTTTGTATATTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCAAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGG CCCCGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTG GTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATC CCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTA CACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGA CCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAG AAAATTGTGCCAGGGATTGT
70	VH n.t. PTA001_A14	TGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAA AGTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCC TGTGGCAAAAAGCCAGGTTTCAGCTGCAACAGTCTGACGCGCGTGGTGA AACCTGGAGCTTCAGTGAAGATATCGTGCAAGGTTTCTGGCTACACCTTCA GTGACCATGCTATTTACTGGATGAAGCAGAGGCCCTGAACAGGGCCTGGAA TGGATTGGATATATTTTCTAGAGATGCTTTTAGTTTGAACAAATGAGAAG TTCAAGGGCAAGGCCACACTGAGTGCAGACACATCCTCCAGCACAGCCTA CATGGAGCTCACCAGCCTGACATTTGAGGATTCTGCAGTCTATTCTGTGC AAGAATGAGAAACTACTTCTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCAGCAAAAACGACACCCCCATCTGTCTATACACTGG CCCCGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGG TCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTAC ACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGAC CGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGA AAATTGTGCCAGGGATTGT

71	VK n.t. PTA001_A1	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAAACGATGAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGA TGTGTGCTGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCA AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGAAA CACCTATTTACATTGGTACCTGCTGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCT GATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGG CAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCACCAGAGTGGAGGCTG AGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTGCTCACGTTG GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA TCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTC GTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAA GATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGATC AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACC AAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACA GACATCAACTTCAACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTTATCC ATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
72	VK n.t. PTA001_A2, PTA001_A3	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAAACGATGAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTATCCATCTCTGACGCTTAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAA CACTTACTTGTATTGGTTTCTGACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCCCT GATATATCGGATGTCCAACCTTGCCTCGGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGGTCAGGAACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACG TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC TGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTG ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTG ACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCA CAAGACATCAACTTCAACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT ATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
73	VK n.t. PTA001_A4	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAAACGATGAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGA CATCGTTATGCTCAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAA GGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGCCAGAGCCTTTTACATAGTAGCAATC AAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAAACCAGGGCAGTCTCCTAAA GTGCTGATTTACTGGCATCCACTAGAGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTC ACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAAGTGTGAA GTCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGCAAGATATATAGCTATCCGTG GACGTTTCGGTGGCGGCACCAGGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTGCAC CAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTT CCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCA AGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGG ACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAC GTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCA CTCACAAGACATCAACTTCAACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAG TCTTATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
74	VK n.t. PTA001_A5	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAAACGATGAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTATCCATCTCTGACGCTTAGTAAGAGTCTCCTGCGCAGTAATGGCA AACTTACTTGTATTGGTTTCTGACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCC TGATATATCGGCTGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGGTCGGAAGTCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC TGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTG ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTG ACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCA CAAGACATCAACTTCAACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT ATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>

75	VK n.t. PTA001_A6	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATAAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTATCCATCTCCTGCACGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAA CACTTACTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCTCT GATATATCGGATGTCCAACCTTGCTCGGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGGTCAAGAACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACG TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC TGTATCCATCCTCCACCATCCAGTGAGCAGTAAACATCTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTG ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTTG ACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCA CAAGACATCAACTTCACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT ATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
76	VK n.t. PTA001_A7	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTTCCATCTCCTGCAGGCTTCTAAGAGTCTCCTGCGTACTAATGGCAA CACTTACTTGCATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCTCT GATATATCGGATGTCCAACCTTGCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGGTCAAGAACTGTTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACG TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAAGGGCTGATGCTGCACCAAC TGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTAAACATCTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTG ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTTG ACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCA CAAGACATCAACTTCACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT ATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
77	VK n.t. PTA001_A8	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTTACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT TCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAAATACCTATTGCCTA CGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGAT ATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAATCA GTATCCATCTCCTGCAGGCTAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAAC ACTTACTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCTCT ATATATCGGCTGTCTAACCTTGCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGC AGTGGGTCAAGAACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGA GGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACATT CGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCACTG TATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTAAACATCTGGAGGTGCCTCAG TCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGGA AGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGAT CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTTGAC CAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCACA AGACATCAACTTCACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTTAT CCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
78	VK n.t. PTA001_A9	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTATCCATCTCCTGCACGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAA CACTTACTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCTCT GATATATCGGATGTCCAACCTTGCTCGGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGGTCAAGAACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACG TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC TGTATCCATCCTCCACCATCCAGTGAGCAGTAAACATCTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTG ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTTG ACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCA CAAGACATCAACTTCACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT ATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>

79	VK n.t. PTA001_A10	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTATCCATCTCCTGCAGGTCCAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCA ACACCTACTTGTATTGGTTTCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCC TCATATATCGGATGTCCAACCTTGCCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGT GCAGTGGGTCAAGAACTGCCTTCACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCAG TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAA CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCT CAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGT GGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACT GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTT GACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTC ACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCT TATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
80	VK n.t. PTA001_A11	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTTCTGTTT TCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAATACCTATTGCCTA CGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCAGCCATGGCCGAT ATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTATCTGTCACTCCTGGAGAGTCA GTATCCATCTCCTGCAGGTCTACTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAAC ACTTACTTGTATTGGTTTCTCCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTG ATATATCGGATGTCCAACCTTGCCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTGG CAGTGGGTCAAGAACTGCCTTCACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTG AGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCAGT TCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC TGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGT GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTG ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTTG ACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCA CAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT ATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
81	VK n.t. PTA001_A12	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACGTAGTAATGGCAA CACTTACTTGTATTGGTTTCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCC GATATATCGGATGTCCAACCTTGCCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGT GCAGTGGGTCAAGAACTGCCTTCACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCAG TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAA CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCT CAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGT GGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACT GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTT GACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTC ACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCT TATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>
82	VK n.t. PTA001_A13	<p>TAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT CTCCATACCCGTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAATACCTATTGCCT ACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCAGCCATGGCCGA TATTGTGATGACCCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTC AGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCGCAGTAATGGCA ACACCTACTTGTATTGGTTTCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCC TGATATATCGGCTGTCCAACCTTGCCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGT GCAGTGGGTCAAGAACTGCCTTCACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAAC TGTATCCATCTTCCCACAATACAGTGAGCAGTTAACAACTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGT GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTG ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTTG ACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCA CAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT ATCCATATGATGTGCCAGATTATGCGAGCTAA</p>

ES 2 574 236 T3

83	VK n.t. PTA001_A14	CGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCC GTTTTTTGGATGGAGTGAAACGATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCC GCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCAAGCCATGGCCGATATTGTGATG ACCCAGGCTGCACCCCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATC TCCTGCACGTCTAGTAAGAGTCTCTGCGTAGTAATGGCAACACTACTTG TATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGG ATGTCCAACCTTGCCTCGGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC AGGAACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGG GTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACGTTCCGGCTCGG GGACAAATTTGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC TTCACAACATCCAGAGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTG CTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAG
84	VH CDR1 n.t. PTA001_A1	GGATTCACTTTCAGTAACTATGGCATGTCT
85	VH CDR1 n.t. PTA001_A2, PTA001 A14	GGCTACACCTTCAGTGACCATGCTATTAC
86	VH CDR1 n.t. PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001 A13	GGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTAC
87	VH CDR1 n.t. PTA001_A4	GGCTACACCCTCACTGACCATACTATTAC
88	VH CDR2 n.t. PTA001_A1	GCCATTAATCGTGATGGTGGTACCCTACTATAACAGACAATGTGAAGGG C
89	VH CDR2 n.t. PTA001_A2	TATATTTATCCTAGACATGGGACTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGG C
90	VH CDR2 n.t. PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001 A10	TATATTTATCCTGAACATGGAACTATTAAGTATAATGAGAAGTTCAAGGG C
91	VH CDR2 n.t. PTA001_A4	TATATTTACCCTAGAGATGGAATAACTGGGTACAATGAGAAGTTCAAGGG C
92	VH CDR2 n.t. PTA001_A7	TATATTTATCCTAGAGATGGTTTTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGG GC
93	VH CDR2 n.t. PTA001_A11	TATATTTATCCTGAACATGGTAGTATTACGTATAATGAGAAGTTCAAGG GC
94	VH CDR2 n.t. PTA001_A12	TATATCTACCCAGAGATGATTTTGCTAAGGTGAATGAGAAGTTCAAGGG C
95	VH CDR2 n.t. PTA001_A13	TATATTTATCCTGAACATGGTACTATTACGTATAATGAGAAGTTCAAGG GC
96	VH CDR2 n.t. PTA001_A14	TATATTTTTCTAGAGATGCTTTTAGTTTGAACAATGAGAAGTTCAAGG GC
97	VH CDR3 n.t. PTA001_A1	TTCTTCTCTGGGACGGCTGGTACTTCGATGTC
98	VH CDR3 n.t. PTA001_A2, PTA001 A14	AGAAACTACTTCTATGTTATGGACTAC

ES 2 574 236 T3

99	VH CDR3 n.t. PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A8, PTA001_A9,PTA001 A10	ACTAACTACTTCTATGTTATGGAGTAT
100	VH CDR3 n.t. PTA001_A4	GGCTATAGTTACAGGAATTACGCGTACTACTATGACTAC
101	VH CDR3 n.t. PTA001_A5, PTA001 A13	AGGAACTATTTGTATATTATGGACTAC
102	VH CDR3 n.t. PTA001_A7	ACTAACTACTTCTATACTATGGACTAC
103	VH CDR3 n.t. PTA001_A11	AGGAACTACTTGTATGTTATGGACTAC
104	VH CDR3 n.t. PTA001_A12	ACTAACTACCTCTATATTATGGACTAC
105	VK CDR1 n.t. PTA001_A1	AGATCTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT
106	VK CDR1 n.t. PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001 A9,PTA001 A14	ACGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
107	VK CDR1 n.t. PTA001_A4	AAGTCCAGCCAGAGCCTTTTACATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGC C
108	VK CDR1 n.t. PTA001_A5, PTA001 A13	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCGCAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
109	VK CDR1 n.t. PTA001_A7	AGGTCTTCTAAGAGTCTCCTGCGTACTAATGGCAACACTTACTTGCAT
110	VK CDR1 n.t. PTA001_A8	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
111	VK CDR1 n.t. PTA001_A10	AGGTCCAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
112	VK CDR1 n.t. PTA001_A11	AGGTCTACTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
113	VK CDR1 n.t. PTA001_A12	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
114	VK CDR2 n.t. PTA001_A1	AAAGTTTCCAACCGATTTTCT
115	VK CDR2 n.t. PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001 A9,PTA001 A14	CGGATGTCCAACCTTGCCTCG
116	VK CDR2 n.t. PTA001_A4	TGGGCATCCACTAGAGAATCT
117	VK CDR2 n.t. PTA001_A5, PTA001_A13	CGGCTGTCCAACCTTGCCTCA

ES 2 574 236 T3

118	VK CDR2 n.t. PTA001_A7, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA
119	VK CDR2 n.t. PTA001_A8	CGGCTGTCTAACCTTGCCTCA
120	VK CDR3 n.t. PTA001_A1	TCTCAAAGTACACATGTGCTCAGC
121	VK CDR3 n.t. PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A14	ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACG
122	VK CDR3 n.t. PTA001_A4	CAGCAATATTATAGCTATCCGTGGACG
123	VK CDR3 n.t. PTA001_A5, PTA001_A8, PTA001_A13	ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA
124	VK CDR3 n.t. PTA001_A7	ATGCAACATCTAGAATATCCATTACG
125	VH7-39 (Genbank AJ851868.3) n.t. 240-269	GGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
126	VHII gen H17 (GenBank X02466.1) n.t. 67-96	GGCTACACCTTCACTGACCATACTATTAC
127	VHII región VH105 (Genbank J00507) n.t.1096-1146	TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTCAAGGG C
128	VK1-110 (GenBank AY591695.1) n.t. 1738-1785	AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT
129	VK1-110 (GenBank AY591695.1) n.t. 1948-1971	TCTCAAAGTACACATGTTCCCTCCC
130	VK8-30 (GenBank AJ235948.1) n.t. 510-560	AAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGTCACTGGC C
131	VK8-30 (GenBank AJ235948.1) n.t. 606-626	TGGGCATCCACTAGGGAATCT
132	VK8-30 (GenBank AJ235948.1) n.t. 723-749	CAGCAATATTATAGCTATCCTCCCACA
133	VK24-140 (GenBank AY591710.1) n.t. 1807-1854	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

ES 2 574 236 T3

134	VK24-140 (GenBank AY591710.1) n.t. 1900-1920	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA
135	VK24-140 (GenBank AY591710.1)n.t. 2017-2043	ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA
136	Cadherina-17 ECD dominios 1-2	QEGKFSGPKPMTFSIYEGQEPSQIIFQFKANPPAVTFELTGETDNIFVIEREGLL YYNRALDRETRSTHNLQVAALDANGIIVEGVPVITIKVKDINDNRPTFLQSKYE GSVRQNSRPGKPFLLYVNATDLDLDPATPNGQLYYQIVIQLPMINNVMYFQINN KTGAISLTREGSQELNPAKNPSYNLVISVKDMGGQSENSFSDDTTSVDIIVTENI WKAPKP
137	Cadherina-17 ECD	QEGKFSGPKPMTFSIYEGQEPSQIIFQFKANPPAVTFELTGETDNIFVIEREGLL YYNRALDRETRSTHNLQVAALDANGIIVEGVPVITIKVKDINDNRPTFLQSKYE GSVRQNSRPGKPFLLYVNATDLDLDPATPNGQLYYQIVIQLPMINNVMYFQINN KTGAISLTREGSQELNPAKNPSYNLVISVKDMGGQSENSFSDDTTSVDIIVTENI WKAPKPVEMVENSTDPHPKITQVRWNDPGAQYSLVDKEKLPFPFSIDQEG DIYVTQPLDREEKDAYVFYAVAKDEYGKPLSYPLEIHKVKDINDNPPTCPSP VTVFEVQENERLGNSIGTLTAHDRDEENTANSFLNYRIVEQTPKLPMDGLFLI QTYAGMLQLAKQSLKKQDTPQYNLTIEVSDKDFKTLCFVQINVIDINDQIPIFE KSDYGNLTLAEDTNIGSTILTIQATDADEPFTGSSKILYHIIKGDSEGR LGVDTD PHTNTGYVIIKKPLDFETA AVSNIVFKAENPEPLVFGVKYNASSFAKFTLIVTD VNEAPQFSQHVFQAKVSEDVAIGTKVGNVTAKDPEGLDISYSLR GDRGWLK IDHVTGEIFSVAPLDREAGSPYRVQVVATEVGGSSLSVSEFHLILMDVNDNPP RLAKDYTG LFFCHPLSAPGSLIFEATDDDQHLFRGPHFTFSLGSGSLQNDWEV SKINGTHARLSTRHTDFEEREYVVLIRINDGGRPPLEGIVSLPVTFCSCVEGSCF RPAGHQGTGIPTVGM

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo anti-Cadherina-17 aislado que comprende:
 - una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 4;
 - una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 8;
 - 5 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 17;
 - una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 24;
 - una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 30; y
 - una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 34,
- 10 opcionalmente en donde cualquiera de las SEQ ID NOs: 4, 8, 17, 24, 30 o 34 comprende independientemente una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones conservadoras de los aminoácidos,
 - en donde el anticuerpo es capaz de ser internalizado en una célula que expresa Cadherina-17.
2. Un anticuerpo anti-Cadherina-17 aislado tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde cualquiera de las SEQ ID NOs: 4, 8, 17, 24, 30 o 34 comprende independientemente una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones conservadoras de los aminoácidos con cadenas laterales básicas.
- 15 3. Un anticuerpo anti-Cadherina-17 aislado tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde cualquiera de las SEQ ID NOs: 4, 8, 17, 24, 30 o 34 comprende independientemente una o dos sustituciones conservadoras de aminoácidos.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.
- 20 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo entero, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de una sola cadena, un anticuerpo defucosilado, un mimético de anticuerpo y un anticuerpo biespecífico preferiblemente en donde dicho fragmento es un anticuerpo de dominio.
- 25 6. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes conjugado con un agente terapéutico.
7. El inmunoconjugado de la reivindicación 6 en donde el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radioactivo.
- 30 8. Una composición que comprende el anticuerpo aislado o porción que se une al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un inmunoconjugado de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y ligera del anticuerpo o porción que se une al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Una célula hospedera que comprende:
- 35 (I) el vector de expresión de la reivindicación 10; o

(li) un primer vector de expresión que codifica la cadena pesada del anticuerpo o porción que se une al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un segundo vector de expresión que codifica la cadena ligera del anticuerpo o porción que se une al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

12. Un método para preparar un anticuerpo anti-Cadherina-17, comprendiendo dicho método los pasos de:

5 obtener una célula hospedera que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

cultivar la célula hospedera en un cultivo de células hospedera;

proporcionar condiciones de cultivo de la célula hospedera en donde las una o más moléculas de ácido nucleico se expresan; y recuperan el anticuerpo de la célula hospedera o del cultivo de células hospedera.

10 13. Un método de fabricación de anticuerpos anti-Cadherina-17-, que comprende los pasos de:

recuperar ARNm de los linfocitos **B** de un animal que ha sido inmunizado con un péptido de Cadherina-17;

convertir dicho ARNm en ADNc;

expresar dicho ADNc en fagos de manera que los anticuerpos anti-Cadherina-17 codificados por dicho ADNc se presenten en la superficie de dichos fagos;

15 seleccionar fagos que presentan anticuerpos anti-Cadherina-17;

recuperar moléculas de ácido nucleico a partir de dichos fagos seleccionados que codifican dichas inmunoglobulinas anti-cadherina-17;

expresar dichas moléculas de ácidos nucleicos recuperados en una célula hospedera; y

20 recuperar anticuerpos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a partir de dicha célula hospedera que se une a la Cadherina-17.

14. Un anticuerpo anti-Cadherina-17, o porción que se une al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un inmunoconjugado de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para uso en el tratamiento o prevención de un cáncer asociado con las células objetivo que expresan Cadherina-17 .

25 15. El anticuerpo, o porción que se une al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicha enfermedad es un cáncer humano.

16. El anticuerpo, o porción que se une al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho cáncer humano es cáncer colorrectal.

FIG. 1 Anti-Cadherina-17 PTA001_A1 VH

1 tgactgggaaaaccctggcggttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcctaccgctcttattaccocctgtggcaaaagccgaagt
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A E V

121 cagctgttggagactgggggagcgtagtgaagcccgagggtcccttaaactctcctgt
 Q L L E T G G G V V K P G G S L K L S C

CDR1
 ~~~~~

181 gcagcctctggattcactttcagtaactatggcatgtcttgggttcgccagactccggag  
 A A S G F T F S N Y G M S W V R Q T P E

**CDR2**  
 ~~~~~

241 aagaggctggagtggtgcagccattaatcgtgatggtggtaccacactatacagac
 K R L E W V A A I N R D G G T T Y Y T D

~~~~~

301 aatgtgaaggccgattcaccatctccagagacaatgccaagaacagcctgtacctgcaa  
 N V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q

~~~~~

361 atgagcagctctgaggtctgaggacacagccttgtattactgtgcaagacagttccttctc
 M S S L R S E D T A L Y Y C A R Q F L L

CDR3
 ~~~~~

421 tgggacggctggactctgatgtctggggcgcaggaccacggtcaccgtctcctcagcc  
 W D G W Y F D V W G A G T T V T V S S A

481 aaaacgacacccccatctgtctatccactggccctggatctgctgcccactaactcc  
 K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S

541 atggtgaccctgggatgctgtcaagggtatattccctgagccagtgacagtgacctgg  
 M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T W

601 aactctggatccctgtccagcgtgtgcacaccttccagctgtcctgcagctctgacctc  
 N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L

661 tacactctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagacctcacc  
 Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V T

721 tgcaacgttggccaccggccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtgccagggat  
 C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D

781 tgt  
 C

**FIG. 2 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A2 VH**

1 tgactgggaaaaccctggcggttacccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaaacaa  
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttatttaccctgtggcaaaagcccaggtt  
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgacgctgagttgggaaacctggagcttcagtgaagatatcctgc  
 Q L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C

**CDR1**

181 aaggtttctggctacaccttcagtgaccatgctattcactggatgagtcagagacctgga  
 K V S G Y T F S D H A I H W M S Q R P G

**CDR2**

241 cagggcctgaaatggattggatatatttatcctagacatgggactactaactacaatgag  
 Q G L K W I G Y I Y P R H G T T N Y N E

301 aacttcaagggcaaggccacactgactgcagacacatcctccagcacagcctacatgcag  
 N F K G K A T L T A D T S S S T A Y M Q

361 ctcaacagcctgacatctgaagattctgcccgtctatttctgtgcaagaatgagaaactac  
 L N S L T S E D S A V Y F C A R M R N Y

**CDR3**

421 ttctatgttatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaacg  
 F Y V M D Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatccactggccctggatctgctgcccactaactcctatggtg  
 T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 accctgggatgcctgggtcaagggctatttccctgagccagtgacagtgacctggaactct  
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctgacctctacact  
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcactggcccagcgagaccgtcacctgcaac  
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccaccggccagcagcaccacaggtggacaagaaaattgtgccagggtattgt  
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

**FIG. 3 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A3 VH**

1 tgactgggaaaaccctggcggttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa  
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttatttaccctgtggcaaaagcccaggtt  
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 ctgctgcaacagtctgacgctgagttgggaaacctggggcttcagtgaagatatcctgc  
 L L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C

**CDR1**

~~~~~

181 aaggcttctggctacaccttcactgacctgctattcactgggtgaagcagaggcctgaa
 K A S G Y T F T D H A I H W V K Q R P E

CDR2

~~~~~

241 cagggcctggaatggattggatatattatcctgaacatggactattaagtataatgag  
 Q G L E W I G Y I Y P E H G T I K Y N E

~~~~~

301 aagttcaagggaaggccacattgactgcagataaatcctccagcactgcctatatgcag
 K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q

~~~~~

361 ctcaacagcctgacatctgaggattcagcagtgatttctgttcaagactcactaactac  
 L N S L T S E D S A V Y F C S R L T N Y

**CDR3**

~~~~~

421 ttctatggtatggagtattgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaacg
 F Y V M E Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatccactggcccctggatctgctgcccactaactccatggtg
 T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 accctgggatgcctgggtcaagggtatttccctgagccagtgacagtgacctggaactct
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacacctccagctgtcctgcagctctgacctctacact
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgcccccggccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtgccccagggattgt
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

FIG. 4 Anti-Cadherina-17 PTA001_A4 VH

```

1  tgactgggaaaaccctggcggtaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
   - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61  agcactattgcactggcactcttaccgctcttattaccctgtggcaaaagccgaggtt
   S T I A L A L L P L L F T P V A K A E V

121 cagctgcagcagctgtcgctgagttggtgaaacctggagcttcagtgaagatgcatgc
   Q L Q Q S V A E L V K P G A S V K M S C

                               CDR1
                               ~~~~~

181 aaggtttctggctacacctcactgaccatactattcactggatgaagcagaggcctgaa
   K V S G Y T L T D H T I H W M K Q R P E

                               CDR2
                               ~~~~~

241 cagggcctggaatggattggatatattaccctagagatggaataactgggtacaatgag
   Q G L E W I G Y I Y P R D G I T G Y N E

~~~~~

301 aagtccaagggcaaggccactgactgcagacacttcttccagcacagcctacatgcag
   K F K G K A T L T A D T S S S T A Y M Q

~~~~~

361 ctcaacagcctgacatctgaggattctgcagctctatttctgtgccagatggggctatagt
   L N S L T S E D S A V Y F C A R W G Y S

                               CDR3
                               ~~~~~

421 tacaggaattacgcgtactactatgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcc
   Y R N Y A Y Y Y D Y W G Q G T T L T V S

481 tcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggatctgctgcccacaa
   S A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T

541 aactccatgggtgaccctgggatgcctgggtcaagggctatttccctgagccagtgcagtg
   N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V

601 acctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctt
   T W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S

661 gacctctacactctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagacc
   D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T

721 gtcacctgcaacggtgcccccggccagcagcaccacaggtggacaagaaaattgtgccc
   V T C N V A H P A S S T K V D K K I V P

781 agggattgt
   R D C

```

FIG. 5 Anti-Cadherina-17 PTA001_A5 VH

1 tgactgggaaaaccctggcgttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttattaccctgtggcaaaagcccaggt
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgacgctgacttgggaaacctggggcttcagtgaagatatcctgc
 Q L Q Q S D A D L V K P G A S V K I S C

CDR1

~~~~~

181 aaggcttctggctacaccttcaactgacctgctattcactgggtgaaacagaggcctgaa  
 K A S G Y T F T D H A I H W V K Q R P E

**CDR2**

~~~~~

241 cagggcctggaatggattggatataatctgaacatggaactattaagtataatgag
 Q G L E W I G Y I Y P E H G T I K Y N E

~~~~~

301 aagttcaagggcaaggccacattgactgcagataaatcctccagcactgcctatatgcag  
 K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q

~~~~~

361 ctcaacagcctgacatctgaggattcagcagtgatttctgtgcaagactcaggaactat
 L N S L T S E D S A V Y F C A R L R N Y

CDR3

~~~~~

421 ttgtatattatggactcggggcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaacg  
 L Y I M D Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acaccccatctgtctatccactggccctggatctgctgcccactaactccatgggtg  
 T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 accctgggatgcctgtcaagggctatctccctgagccagtgacagtgacctggaactct  
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctgacctctacact  
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcagaccgtcacctgcaac  
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccaccggccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgccagggattgt  
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

**FIG. 6 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A6, PTA001\_A9 and PTA001\_A10 VH**

1 tgactgggaaaaccctggcgttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaaacaa  
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttatttaccctgtggcaaagcccaggtt  
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgacgctgagttggtgaaacctggggcttcagtgaagatatcctgc  
 Q L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C

**CDR1**

~~~~~

181 aaggcttctggctacaccttcaactgaccatgctattcactgggtgaagcagaggcctgaa
 K A S G Y T F T D H A I H W V K Q R P E

CDR2

~~~~~

241 cagggcctggaatggattggatatatttatcctgaacatggaactattaagtataatgag  
 Q G L E W I G Y I Y P E H G T I K Y N E

~~~~~

301 aagtccaagggcaaggccacattgactgcagataaatcctccagcactgcctatatgcag
 K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q

~~~~~

361 ctcaacagcctgacatctgaggattcagcagtgatatttctgttcaagactcactaactac  
 L N S L T S E D S A V Y F C S R L T N Y

**CDR3**

~~~~~

421 ttctatgttatggagtattggggtcaaggacactcagtcaccgtctcctcagccaaaacg
 F Y V M E Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatccactggcccctggatctgctgcccactaactccatggtg
 T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 acctgggatgctgtgcaagggtatttccctgagccagtgacagtgacctggaactct
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctctgacctctacact
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccacccggccagcagcaccgaaggtggacaagaaaattgtgccagggtt
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

FIG. 7 Anti-Cadherina-17 PTA001_A7 VH

1 tgactgggaaaaccctggcggttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttatttaccctgtggcaaaagcccaggtt
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgacgctgagttggtgaaacctggagcctcagtgaagatatcctgc
 Q L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C

CDR1

181 aaggtttctggctacaccttcaactgacctgctattcactggatgaaacagaggcctgaa
 K V S G Y T F T D H A I H W M K Q R P E

CDR2

241 cagggcctggaatggattggatatatttaccctagagatggtttactaagtacaatgag
 Q G L E W I G Y I Y P R D G F T K Y N E

301 aagttcaagggaaggccacactgactgcagacacatcctccagcacagcctacatgcag
 K F K G K A T L T A D T S S S T A Y M Q

361 ctcaacagcctgacatctgaggattctacagtctatttctgtgcaagaatgactaactac
 L N S L T S E D S T V Y F C A R M T N Y

CDR3

421 ttctatactatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaac
 F Y T M D Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatccactggccctggatctgtgcccactaactccatgggtg
 T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 acctgggatgctggtcaagggtatttccctgagccagtgacagtgacctggaactct
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttccagctgtcctgcagctgacctctacact
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccaccceggccagcagcaccgaaggtggacaagaaaattgtgccagggattgt
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

FIG. 8 Anti-Cadherina-17 PTA001_A8 VH

```

1   tgactgggaaaaccctggcgttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
   - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61  agcactattgcactggcactcttaccgctcttattaccctgtggcaaaagcccagtt
   S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgacgctgacttgggtgaaacctggggcttcagtgaagatatcctgc
   Q L Q Q S D A D L V K P G A S V K I S C

                                CDR1
                                ~~~~~~
181 aagcttctggctacaccttcactgaccatgctattcactgggtgaaacagaggcctgaa
   K A S G Y T F T D H A I H W V K Q R P E

                                CDR2
                                ~~~~~~
241 cagggcctggaatggattggatatattatcctgaacatggaactattaagtataatgag
   Q G L E W I G Y I Y P E H G T I K Y N E

                                ~~~~~~
301 aagttcaagggaaggccacattgactgcagataaatcctccagcactgcctatatgcag
   K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q

                                ~~~~~~
361 ctcaacagcctgacatctgaggattcagcagtgatattctgttcaagactcactaactac
   L N S L T S E D S A V Y F C S R L T N Y

                                CDR3
                                ~~~~~~
421 ttctatgttatggagtattgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaacg
   F Y V M E Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatccactggcccctggatctgctgcccactaactccatgggtg
   T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 accctgggatgcctggtcaagggtatcttccctgagccagtgacagtgacctggaactct
   T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtcagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgacctctacact
   G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac
   L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccaccgccagcagcaccgaaggtggacaagaaaattgtgccagggattgt
   V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

```

FIG. 9 Anti-Cadherina-17 PTA001_A11 VH

1 tgactgggaaaaccctggcggttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttatttaccctgtggcaaaagcccaggtt
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgacgctgagttgggaaacctgggcttcagtgaagatatcctgc
 Q L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C

CDR1
 ~~~~~

181 aaggcttctggctacaccttactgacctgctatttactgggtgaagcagaggcctgaa  
 K A S G Y T F T D H A I H W V K Q R P E

**CDR2**  
 ~~~~~

241 cagggcctggaatggattggatataatttaccctgaacatggtagtattacgtataatgag
 Q G L E W I G Y I Y P E H G S I T Y N E

~~~~~

301 aagttcaagggcaaggccacattgactgcagataaatcctccagtactgtctatatgcac  
 K F K G K A T L T A D K S S S T V Y M H

~~~~~

361 ctcaatagcctgacatctgaggattcagcagtgatatttctgtgcaagactcaggaactac
 L N S L T S E D S A V Y F C A R L R N Y

CDR3
 ~~~~~

421 ttgtatgttatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaacg  
 L Y V M D Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatccactggcccctggatctgctgcccactaactccatgggtg  
 T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 accctgggatgctgtcaagggctatttccctgagccagtgcagtgacctggaactct  
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgacctctacact  
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac  
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccccccggccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtgccagggattgt  
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

**FIG. 10 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A12 VH**

1 tgactgggaaaaccctggcgttaccacgctttgtacatggagaaaaataaagtgaacaa  
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttatttaccctgtggcaaaagcccagggt  
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgaggctgagcttgtgaagcctgggcttcagtgaagctgtcctgc  
 Q L Q Q S E A E L V K P G A S V K L S C

**CDR1**  
 ~~~~~

181 aaggcttctggctacaccttcactgaccatgctattcactggatgaacagaggcctgaa
 K A S G Y T F T D H A I H W M K Q R P E

CDR2
 ~~~~~

241 cagggcctggaatggattggatatactacccagagatgattttgctaaggatgaatgag  
 Q G L E W I G Y I Y P R D D F A K V N E

~~~~~

301 aagttcaaggccaagccacactgacagcagacacatcctccagcacagcctacatgcag
 K F K G K A T L T A D T S S S T A Y M Q

~~~~~

361 ctcaacagcctgacatctgaggattctgcagtctatttctgtgcaagaatgactaactac  
 L N S L T S E D S A V Y F C A R M T N Y

**CDR3**  
 ~~~~~

421 ctctatattatggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaacg
 L Y I M D Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatccactggcccctggatctgctgcccactaactcctatgggtg
 T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541 accctgggatgcctggcaagggtatctccctgagccagtgcagtgacctggaactct
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgacctctacact
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccaccggccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgccagggtgt
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

FIG. 11 Anti-Cadherina-17 PTA001_A13 VH

```

1  tgactgggaaaacacctggcgcttaccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
   - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61  agcactattgcactggcactcttaccgctottatttaccctgtggcaaaagcccaggtt
   S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121  cagctgcaacagtctgacgctgagttggtgaaacctggggcttcagtgaagatatcctgc
   Q L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C

                                     CDR1
                                     ~~~~~~
181  aaggcttctggctacaccttcaactgaccatgctattcactgggtgaagcagaggcctgaa
   K A S G Y T F T D H A I H W V K Q R P E

                                     CDR2
                                     ~~~~~~
241  cagggcctggaatggattggatatatttatcctgaacatgggtactattacgtataatgag
   Q G L E W I G Y I Y P E H G T I T Y N E

~~~~~
301  aagttcaagggcaaggccacattgactgcagataaatcctccagtactgtctatatgcac
   K F K G K A T L T A D K S S S T V Y M H

                                     ~~~~~~
361  ctcaatagcctgacatctgaggattcagcagtgatattctgtgcaagactcaggaactat
   L N S L T S E D S A V Y F C A R L R N Y

                                     CDR3
                                     ~~~~~~
421  ttgtatattatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaagc
   L Y I M D Y W G Q G T S V T V S S A K T

481  acacccccatctgtctatccactggccccggatctgctgcccactaactccatgggtg
   T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V

541  accctgggatgcctggtaagggtatattccctgagccagtgacagtgacctggaactct
   T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601  ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttccagctgtcctgcagctctgacctctacact
   G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661  ctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac
   L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721  gttgccacccggccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgccagggtattgt
   V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

```

FIG. 12 Anti-Cadherina-17 PTA001_A14 VH

1 tgactgggaaaacccctggcgttacccacgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaa
 - L G K P W R Y P R F V H G E N K V K Q

61 agcactattgcactggcactcttaccgctcttatttaccocctgtggcaaaagcccaggtt
 S T I A L A L L P L L F T P V A K A Q V

121 cagctgcaacagtctgacgccgcttggtgaaacctggagcttcagtgaagatatcgtgc
 Q L Q Q S D A A L V K P G A S V K I S C

CDR1

~~~~~

181 aaggtttctggctacaccttcagtgacctgctattcactggatgaagcagaggcctgaa  
 K V S G Y T F S D H A I H W M K Q R P E

**CDR2**

~~~~~

241 cagggcctggaatggattggatatattttcctagagatgcttttagtttgaacaatgag
 Q G L E W I G Y I F P R D A F S L N N E

~~~~~

301 aagttcaagggcaagggcacactgagtgacagacacatcctccagcacagcctacatggag  
 K F K G K A T L S A D T S S S T A Y M E

~~~~~

361 ctaccagcctgacatttgaggattctgcagtctatttctgtgcaagaatgagaaactac
 L T S L T F E D S A V Y F C A R M R N Y

CDR3

~~~~~

421 ttctatgttatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaaacg  
 F Y V M D Y W G Q G T S V T V S S A K T

481 acacccccatctgtctatacactggccctggatctgctgccccaaactaactccatgggtg  
 T P P S V Y T L A P G S A A Q T N S M V

541 accctgggatgcctgggtcaagggctatttccctgagccagtgacagtgacctggaactct  
 T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S

601 ggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgacctctacact  
 G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

661 ctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaac  
 L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N

721 gttgccaccggccagcagcaccgaagtgacaagaaaattgtgccagggtt  
 V A H P A S S T K V D K K I V P R D C

**FIG. 13 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A1 VK**

```

1 taagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctctactgttttccatacc
  - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgttttttggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg
  R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgtgcccaccagccatggccgatgttgctgaccagactccactctcc
  L L L A A Q P A M A D V V L T Q T P L S

181 ctgctgtcactcttggagatcaagcctccatctcttgcagatctagtccagcctttaa
  L P V T L G D Q A S I S C R S S Q S L L
  ~~~~~
CDR1
  ~~~~~
241 cacagtaatggaacacctatttacattggtacctgctgaagccagccagctccaaaag
  H S N G N T Y L H W Y L L K P G Q S P K
  ~~~~~
CDR2
  ~~~~~
301 ctctgatctacaaagttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagtgccagt
  L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S

361 ggatcagggacagatttcacactcaagatcaccagagtgaggctgaggatctgggagtt
  G S G T D F T L K I T R V E A E D L G V
  ~~~~~
CDR3
  ~~~~~
421 tatttctgctctcaaagtacacatgtgctcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctg
  Y F C S Q S T H V L T F G A G T K L E L

481 aaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaaca
  K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T

541 tctggaggtgctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtc
  S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V

601 aagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcag
  K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q

661 gacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcagttgaccaaggacgagtat
  D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y

721 gaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttaccattgtc
  E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V

781 aagagcttcaacaggaatgagtcttatccatgatgtgccagattatgagagctaa
  K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -
  
```

**FIG. 14 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A2 and PTA001\_A3 VK**

```

1   taagattagcggatcctacgtgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccatacc
   - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61  cgttttttggatggagtgaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg
   R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactgctgcccaccagccatggccgatattgtgatgaccaggctgcaccctct
   L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtacctgtcactcctggagagtcagtatccatctcctgcaogtctagtaagagtcctctg
   V P V T P G E S V S I S C T S S K S L L

      CDR1
      ~~~~~
241 cgtagtaatggcaacttacttgtattggttcctgcagaggccaggccagtctcctcag
 R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

 CDR2
      ~~~~~
301 ctctgatataatcgatgtccaacttgctcctcgggagtcaccagacaggttcagtgccag
   L L I Y R M S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaactgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtt
   G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

      CDR3
      ~~~~~
421 tattactgtatgcaacatctagaatatcctttcagctcgggctcggggacaaagtggaa
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G S G T K L E

481 ataaaacgggctgatgtgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttta
 I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L

541 acatctggaggtgctcctcagtcgtgtgcttcttgacaacttctaccccaaagacatcaat
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcagttgaccaaggacgag
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccatt
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtccttatccatgatgtgcccagattatgagcagctaa
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

```

**FIG. 15 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A4 VK**

```

1 taagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccatacc
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgttttttgggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgtgcccaccagccatggccgacatcgttatgtctcagttccatectcc
 L L L A A Q P A M A D I V M S Q S P S S

181 ctagctgtgtcagttggagagaaggttactatgagctgcaagtccagccagcctttta
 L A V S V G E K V T M S C K S S Q S L L

   ~~~~~
   CDR1
   ~~~~~
241 catagtagcaatcaaaagaactacttggcctggtaccagcagaaaccagggcagttcct
 H S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P

   ~~~~~
   CDR2
   ~~~~~
301 aaagtgctgatttactggcctccactagagaatctggggccctgatcgcttcacaggc
 K V L I Y W A S T R E S G V P D R F T G

361 agtggatctgggacagatttactctcaccatcaccagtggaagtctgaagacctggca
 S G S G T D F T L T I T S V K S E D L A

   ~~~~~
   CDR3
   ~~~~~
421 gtttattactgtcagcaatattatagctatccgtggacggttcggtggcggcaccagcctg
 V Y Y C Q Q Y Y S Y P W T F G G G T R L

481 gaaatcaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcag
 E I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q

541 ttaacatctggaggtgctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaagacatc
 L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I

601 aatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggact
 N V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T

661 gatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcacctcacgttgaccaaggac
 D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D

721 gagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcacc
 E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P

781 attgtcaagagcttcaacaggaatgagtttatccatgatgtgccagattatgcgagc
 I V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S

841 taa

```

**FIG. 16 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A5 VK**

1 taagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccatacc  
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgtttttttggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg  
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgctgccaaccagccatggccgatattgtgatgaccaggctgcacccctc  
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtacctgtcactcctggagagtcagtatccatctcctgcaggctctagtaagagtctcctg  
 V P V T P G E S V S I S C R S S K S L L

~~~~~  
**CDR1**  
 ~~~~~

241 cgcagtaatggcaacacttacttgattggttcctgcagaggccaggccagtctcctcag  
 R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

~~~~~  
**CDR2**  
 ~~~~~

301 ctccctgatatcggtgtccaacctgcctcaggagtcaccagacaggttcagtgccagt  
 L L I Y R L S N L A S G V P D R F S G S

361 gggctcggaaactgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtt  
 G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

~~~~~  
**CDR3**  
 ~~~~~

421 tattactgtatgcaacatctagaatacctttcacattcggctcggggacaaagtggaa  
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G S G T K L E

481 ataaaaagggtgatgctgcaccaactgtatccatctccaccatccagtgagcagtta  
 I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L

541 acatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaat  
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat  
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcagttgaccaaggacgag  
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcacccatt  
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtcttatccatgatgtgccagattatgagagctaa  
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

**FIG. 17 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A6 VK**

1 taagattagcggatcctacactgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccatacc  
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgttttttggatggagtgaacgataaaatacctattgcctacggcagccgctggattg  
 R F F G W S E T I K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgctgccaaccagccatggccgatattgtgatgaccaggctgcaccctct  
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtacctgtcactcctggagatcagtatccatctcctgcacgtctagtaagagtctcctg  
 V P V T P G E S V S I S C T S S K S L L

~~~~~  
**CDR1**  
 ~~~~~

241 cgtagtaatggcaacttacttgattggttcctgcagaggccaggccagtctcctcag  
 R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

~~~~~  
**CDR2**  
 ~~~~~

301 ctctgatatatcggatgtccaaccttgctcgggagtccagacaggttcagtggcagt  
 L L I Y R M S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaactgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtt  
 G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

~~~~~  
**CDR3**  
 ~~~~~

421 tattactgtatgcaacatctagaatatcctttcacgttcggctcggggacaaagtggaa  
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G S G T K L E

481 ataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcctcccaccatccagtgagcagtta  
 I K R A D A A P T V S I L P P S S E Q L

541 acatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaagacatcaat  
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat  
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgag  
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccatt  
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagacttcaacaggaatgagtccttatccatgatgtgccagattatgcgagctaa  
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

**FIG. 18 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A7 VK**

1 taagattagcggatcctacctgacgcttttttatcgcaactctctactgtttctccataacc  
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgttttttggatggagtgaaacgatgaaatcctattgcctacggcagccgctggattg  
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgtgccaaccagccatggccgatattgtgatgaccaggtgcaccctct  
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtacctgtcaectcctggagagtcagtttccatctcctgcaggctcttaagagtctcctg  
 V P V T P G E S V S I S C R S S K S L L

**CDR1**

241 cgtactaatggcaacacttacttgattggttcctgcagaggccaggccagtctcctcag  
 R T N G N T Y L H W F L Q R P G Q S P Q

**CDR2**

301 ctctgatataatcggatgtccaaccttgccctcaggagtcaccagacaggttcagtggcagt  
 L L I Y R M S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaactgttttcacactgagaatcagtagagtggaggctgaggatgtgggtgtt  
 G S G T V F T L R I S R V E A E D V G V

**CDR3**

421 tattactgtatgcaacatctagaatatccattcagttcggctcggggacaaagtggaa  
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G S G T K L E

481 ataaaaagggetgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagtta  
 I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L

541 acatctggaggctgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaat  
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat  
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgag  
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccatt  
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtcttatccatgatgtgcccagattatgagcagctaa  
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

**FIG. 19 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A8 VK**

1 taagattagcggatcctaccttacgctttttatcgcaactctctactgtttctccataacc  
 - - - R I L P Y A F Y R N S L L F L H T

61 cgttttttggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg  
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgctgccaaccagccatggccgatattgtgatgacccaggctgcaccctct  
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtacctgtcactcctggagaatcagtatccatctcctgcaggctctagtaagagtctcctg  
 V P V T P G E S V S I S C R S S K S L L

~~~~~  
**CDR1**  
 ~~~~~

241 cgtagtaatggcaacacttacttgattggttcctgcagaggccaggccagtctcctcag  
 R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

~~~~~  
**CDR2**  
 ~~~~~

301 ctctgatataatcggtgttaacctgcctcaggagtcccagacaggttcagtggtcagt  
 L L I Y R L S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaactgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtt  
 G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

~~~~~  
**CDR3**  
 ~~~~~

421 tattactgtatgcaacatctagaatatcctttcacattcggctcggggacaaagtggaa  
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G S G T K L E

481 ataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagtta  
 I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L

541 acatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaat  
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat  
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacgttgaccaaggaccag  
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccatt  
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtcttatccatgatgtgcccagattatgagagctaa  
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

**FIG. 20 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A9 VK**

1 taagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccataacc  
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgtttttttggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg  
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgctgcccacccagccatggccgatattgtgatgaccaggtgcaccctct  
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtagctgtcactcctggagagtcagtatccatctcctgcagctctagtaagagctctcctg  
 V P V T P G E S V S I S C T S S K S L L

**CDR1**

241 cgtagtaatggcaacacttacttgtattggttcctgcagaggccaggccagctctcctcag  
 R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

**CDR2**

301 ctctgatataatcggatgtccaaccttgccctcgggagtcaccagacaggttcagtgccagt  
 L L I Y R M S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaactgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtt  
 G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

**CDR3**

421 tattactgtatgcaacatctagaatatcctttcacgttcggctcggggacaaagtggaa  
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G S G T K L E

481 ataaaaagggtgatgtgacccaactgtatccatctccccaccatccagtgagcagtta  
 I K R A D A A P T V S I S P P S S E Q L

541 acatctggagggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaat  
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat  
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgag  
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccatt  
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtccttatccatgatgtgcccagattatgagcagctaa  
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

**FIG. 21 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A10 and PTA001\_A12 VK**

1 taagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccatacc  
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgttttttggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg  
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgtgccaaccagccatggccgatattgtgatgaccaggctgcacctct  
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

**t in A12**

~

181 gtacctgtcactcctggagagtgcagatccatctcctgcaggtccagtaagagtctcctg  
 V P V T P G E S V S I S C R S S K S L L

**CDR1**

~~~~~

241 cgtagtaatggcaacacttacttgattggttctctgcagaggccaggccagtctcctcag  
 R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

**CDR2**

~~~~~

301 ctctcatatatcggatgtccaacctgcctcaggagtccagacaggttcagtgccagt  
 L L I Y R M S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaactgccttcacactgagaatcagtagagtggaggctgaggatgtgggtgt  
 G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

**CDR3**

~~~~~

421 tattactgtatgcaacatctagaatatcctttcacgttcggaggggggaccaagctggaa  
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G G G T K L E

481 ataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagtta  
 I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L

541 acatctggaggtgcctcagtcgtgcttcttgaacaacttctaccccaagacatcaat  
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat  
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaagacagcacctacagcatgagcagaccctcacgttgaccaaggacgag  
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaaccatt  
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtccttatccatatgatgtgccagattatgagcagctaa  
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

**FIG. 22 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A11 VK**

1 taagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctcttctgtttctccatacc  
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgtttttttggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg  
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgctgcccacccagccatggccgatattgtgatgaccagcctgcaccctct  
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtatctgtcactcctggagagtcagtatccatctcctgcaggtctactaagagtctcctg  
 V S V T P G E S V S I S C R S T K S L L

**CDR1**

241 cgtagtaatggcaacacttacttgattggttcctccagaggccagccagtcctcctcag  
 R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

**CDR2**

301 ctctgatataatcggatgtccaaccttgctcaggagtcaccagacaggttcagtgccagt  
 L L I Y R M S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaactgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtt  
 G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

**CDR3**

421 tattactgtatgcaacatctagaatatcctttcacggttcggaggggggaccaagctggaa  
 Y Y C M Q H L E Y P F T F G G G T K L E

481 ataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagtta  
 I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L

541 acatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaagacatcaat  
 T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat  
 V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacggttgaccaaggacgag  
 Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccatt  
 Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtccttatccatgatgatgtgccagattatgcgagctaa  
 V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

**FIG. 23 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A13 VK**

```

1 taagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccataacc
 - - - R I L P D A F Y R N S L L F L H T

61 cgttttttggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattg
 R F F G W S E T M K Y L L P T A A A G L

121 ttattactcgtgccaaccagccatggccgatattgtgatgaccaggtgcaccctct
 L L L A A Q P A M A D I V M T Q A A P S

181 gtacctgtcactcctggagagtcagatccatctcctgcaggtctagtaagagtctcctg
 V P V T P G E S V S I S C R S S K S L L

 CDR1
      ~~~~~
241 cgcagtaatggcaacacttacttgatattggttcctgcagaggccagtcctcctcag
   R S N G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q

      CDR2
      ~~~~~
301 ctctgatataatcggctgtccaaccttgctcagaggtcccagacaggttcagtgccag
 L L I Y R L S N L A S G V P D R F S G S

361 gggtcaggaaactgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtt
 G S G T A F T L R I S R V E A E D V G V

 CDR3
      ~~~~~
421 tattactgtatgcaacatctagaatatcctttcacattcggctcggggacaaagtggaa
   Y Y C M Q H L E Y P F T F G S G T K L E

481 ataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccacaatacagtgagcagtta
   I K R A D A A P T V S I F P Q Y S E Q L

541 acaactggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaat
   T T G G A S V V C F L N N F Y P K D I N

601 gtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgat
   V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D

661 caggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcagttgaccaaggacgag
   Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E

721 tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccatt
   Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

781 gtcaagagcttcaacaggaatgagtccttatccatgatgatgtgccagattatgagagctaa
   V K S F N R N E S Y P Y D V P D Y A S -

```

**FIG. 24 Anti-Cadherina-17 PTA001\_A14 VK**

1 cggatcctacctgacgcgtttttatcgcaactctctactgtttctccataaccgcttttttt  
 R I L P D A F Y R N S L L F L H T R F F

61 ggatggagtgaaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattggtattactc  
 G W S E T M K Y L L P T A A A G L L L L

121 gctgccaaccagccatggccgatattgtgatgaccaggctgcaccctctgtacctgtc  
 A A Q P A M A D I V M T Q A A P S V P V

**CDR1**

181 actcctggagagtcagtatccatctcctgcacgtctagtaagagtcctcctgcgtagtaat  
 T P G E S V S I S C T S S K S L L R S N

~~~~~

241 ggcaacacttacttgtattggttcctgcagaggccagtcctcctcagctcctgata
 G N T Y L Y W F L Q R P G Q S P Q L L I

CDR2

~~~~~

301 tatcggatgtccaaccttgccctcgggagtcaccagacagttcagtgccagtggtcagga  
 Y R M S N L A S G V P D R F S G S G S G

361 actgctttcacactgagaatcagtagagtgaggctgaggatgtgggtgtttattactgt  
 T A F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C

**CDR3**

~~~~~

421 atgcaacatctagaatatcctttcagttcggctcggggacaaatttggaataaaacgg
 M Q H L E Y P F T F G S G T N L E I K R

481 gctgatgtgcaccaactgtatccatcttcacaacatccagagagcagttaacatctgga
 A D A A P T V S I F T T S R E Q L T S G

541 ggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaagacatcaatgtcaag
 G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K

FIG. 25 VH CDR1 Alineaciones

PTA001_A1
 VH CDR1
 VH7-39
 GGATTCACCTTTCAGTAACTATGGCATGTCT
 GGATTCACCTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT

PTA001_A2, PTA001_A14
 VH CDR1
 VHII gen H17
 GGCTACACCTTTCAGTGACCATGCTATTCAC
 GGCTACACCTTTCAGTGACCATGCTATTCAC

PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A7, PTA001_A8, PTA001_A9,
 PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12, PTA001_A13
 VH CDR1
 VHII gen H17
 GGCTACACCTTTCAGTGACCATGCTATTCAC
 GGCTACACCTTTCAGTGACCATGCTATTCAC

PTA001_A4
 VH CDR1
 VHII gen H17
 GGCTACACCTTTCAGTGACCATACTATTCAC
 GGCTACACCTTTCAGTGACCATACTATTCAC

FIG. 26 VH CDR2 Alineaciones

```

PTA001_A2
VH CDR2          TATATTTATCCTAGACATGGGACTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          ***** * ***** ***** *****

PTA001_A3, PTA001_A5, PTA001_A6, PTA001_A8, PTA001_A9, PTA001_A10
VH CDR2          TATATTTATCCTGAACATGGAACTATTAAGTATAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          * **** * ** ***** *****

PTA001_A4
VH CDR2          TATATTTACCCTAGAGATGGAATAACTGGGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          ***** * ** ***** *****

PTA001_A7
VH CDR2          TATATTTATCCTAGACATGGGACTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          ***** * ***** *****

PTA001_A11
VH CDR2          TATATTTATCCTGAACATGGTAGTATTACGTATAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          * ***** ** ** ***** *****

PTA001_A12
VH CDR2          TATATCTACCCAGAGATGATTTTGCTAAGGTGAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          ***** * * ***** *****

PTA001_A13
VH CDR2          TATATTTATCCTGAACATGGTACTATTACGTATAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          * ***** ** ** ***** *****

PTA001_A14
VH CDR2          TATATTTTTCCTAGAGATGCTTTTAGTTTGAACAATGAGAAGTTCAAGGGC
VHII región VH105 TATATTTATCCTAGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGC
*****          ***** * ** * ***** *****
    
```

FIG. 27 VK CDR1 Alineaciones

PTA001_A1
VK CDR1 AGATCTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT
VK1-110 AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT

PTA001_A4
VK CDR1 AAGTCCAGCCAGAGCCTTTTACATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGCC
VK8-30 AAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGCC

PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001_A14
VK CDR1 GTCTAGTAAGAGTCTCCTGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
VK24-140 GTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

PTA001_A5, PTA001_A13
VK CDR1 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCGCAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
VK24-140 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

PTA001_A7
VK CDR1 AGGCTTCTAAGAGTCTCCIGCGTACTAATGGCAACACTTACTTGCAT
VK24-140 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

PTA001_A8
VK CDR1 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
VK24-140 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

PTA001_A10
VK CDR1 AGGTCCAGTAAGAGTCTCCIGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
VK24-140 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

PTA001_A11
VK CDR1 AGGCTACTAAGAGTCTCCIGCGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
VK24-140 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

PTA001_A12
VK CDR1 AGGCTAGTAAGAGTCTCCTACGTAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT
VK24-140 AGGCTAGTAAGAGTCTCCIGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT

FIG. 28 VK CDR2 Alineaciones

```

PTA001_A4
VK CDR2      TGGGCATCCACTAGAGAATCT
VK8-30      TGGGCATCCACTAGGGAATCT
              *****

PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001_A14
VK CDR2      CGGATGTCCAACCTTGCCTCG
VK24-140     CGGATGTCCAACCTTGCCTCA
              *****

PTA001_A5, PTA001_A13
VK CDR2      CGGCTGTCCAACCTTGCCTCA
VK24-140     CGGATGTCCAACCTTGCCTCA
              *** *****

PTA001_A7, PTA001_A10, PTA001_A11, PTA001_A12
VK CDR2      CGGATGTCCAACCTTGCCTCA
VK24-140     CGGATGTCCAACCTTGCCTCA
              *****

PTA001_A8
VK CDR2      CGGCTGTCTAACCTTGCCTCA
VK24-140     CGGATGTCCAACCTTGCCTCA
              *** **** *****
    
```

FIG. 29 VK CDR3 Alineaciones

```

PTA001_A1
VK CDR3      TCTCAAAGTACACATGTGCTCAG
VK1-110     TCTCAAAGTACACATGTFCTCCC
              ***** * *

PTA001_A4
VK CDR3      CAGCAATATTATAGCTATCCGTGGACG
VK8-30      CAGCAATATTATAGCTATCCTCCACA
              ***** **

PTA001_A2, PTA001_A3, PTA001_A6, PTA001_A9, PTA001_A10, PTA001_A11,
PTA001_A12, PTA001_A14
VK CDR3      ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACG
VK24-140     ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA
              *****

PTA001_A5, PTA001_A8, PTA001_A13
VK CDR3      ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA
VK24-140     ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA
              *****

PTA001_A7
VK CDR3      ATGCAACATCTAGAATATCCATTCACG
VK24-140     ATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACA
              *****
    
```

Transferencia wester de PTA001_A1 anti-Cadherina

Error! No pueden crearse objetos a partir de códigos de campo de edición

FIG. 30

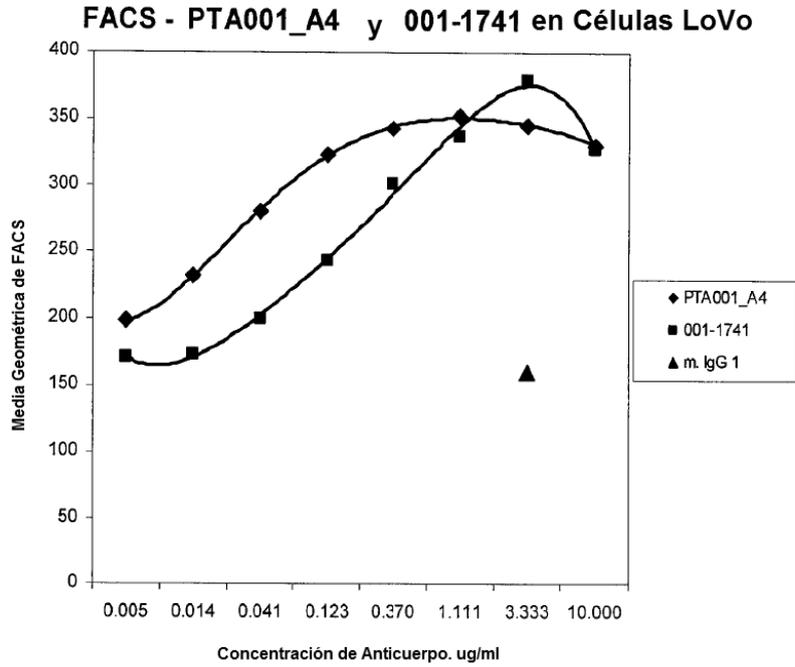


FIG. 31

FACS: PTA001_A4 vs LoVo, LS 174T

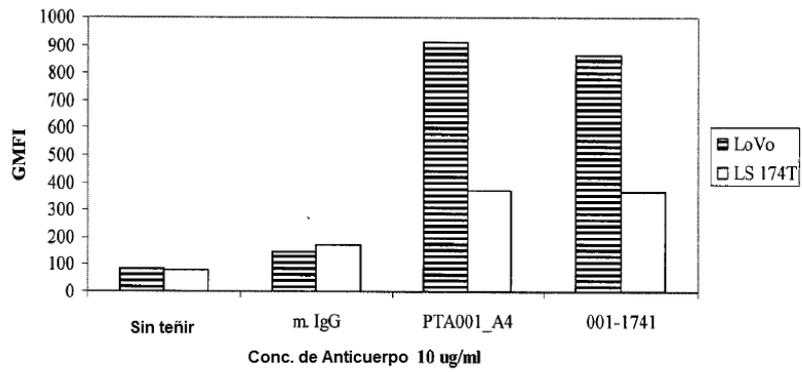


FIG. 32

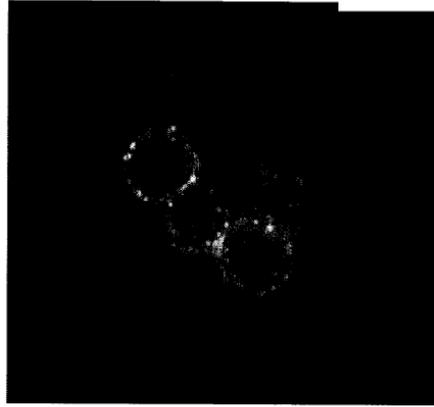


FIG. 33A

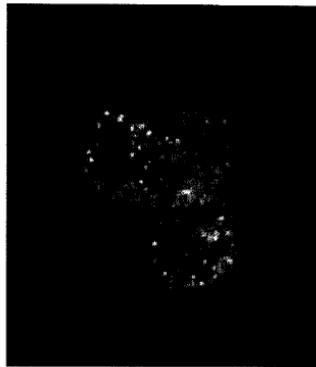


FIG. 33B

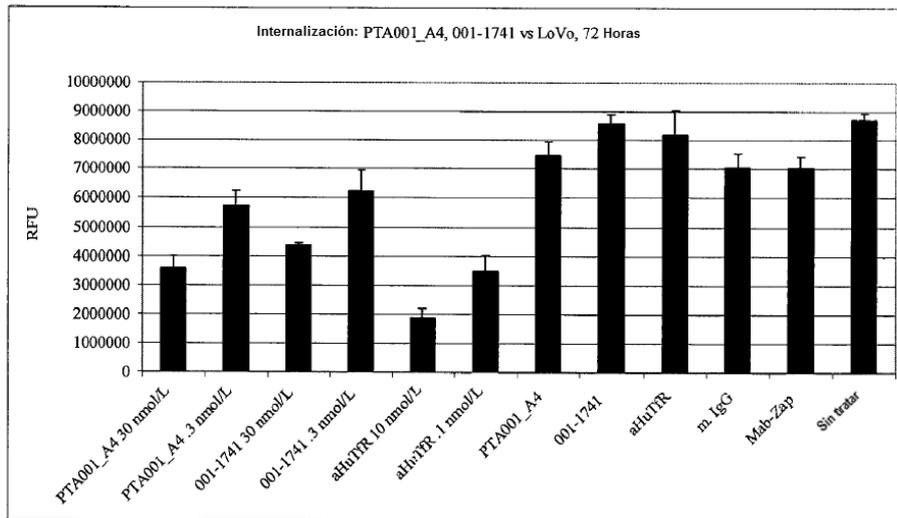


FIG. 34A

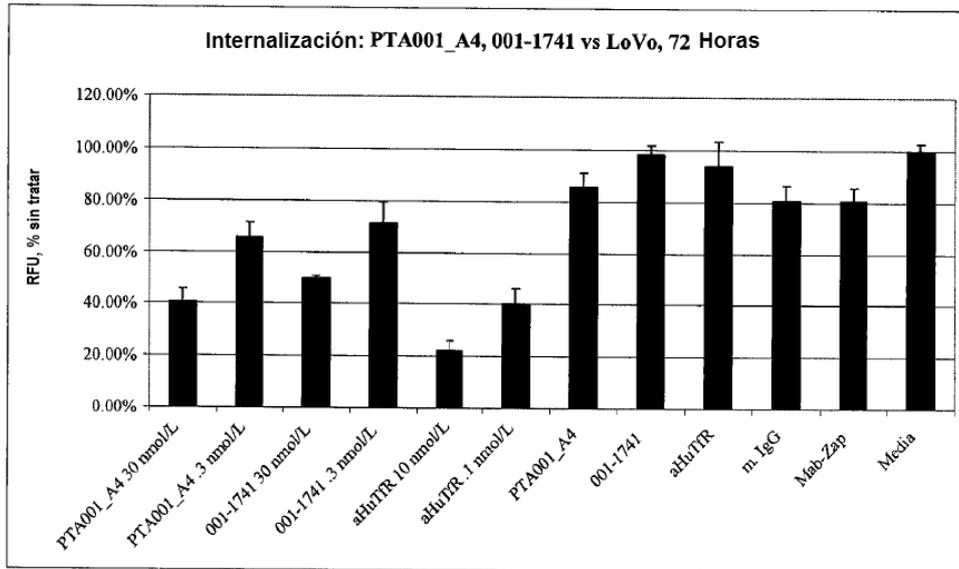


FIG. 34B

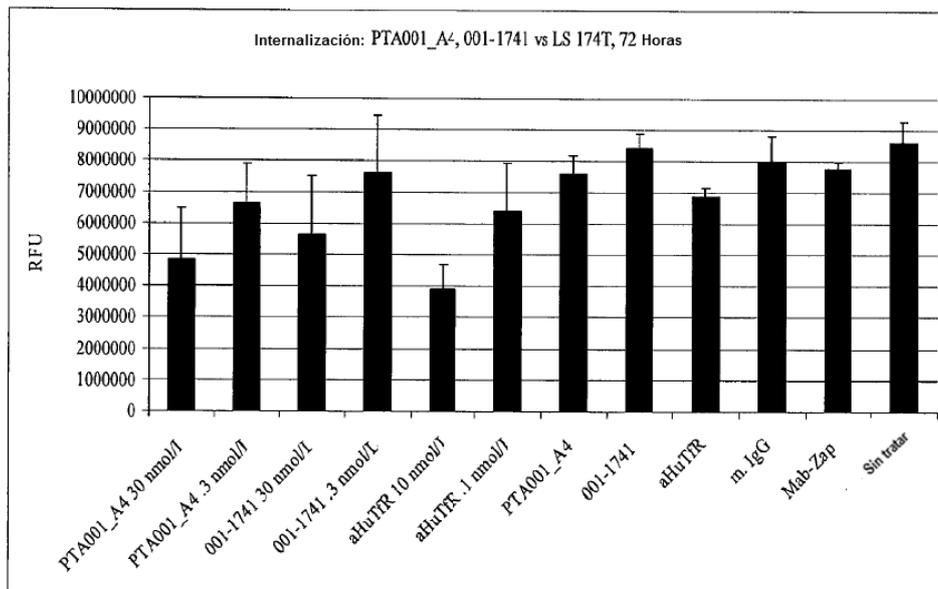


FIG. 34C

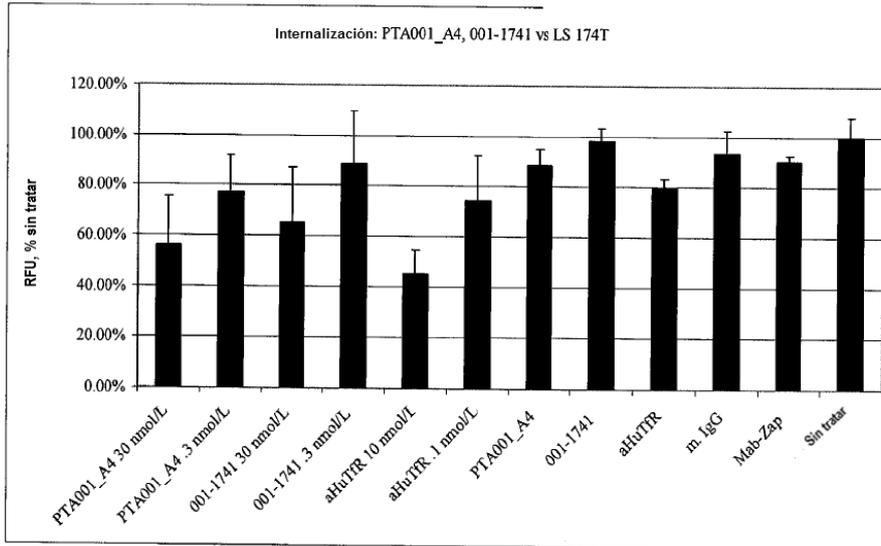


FIG. 34D

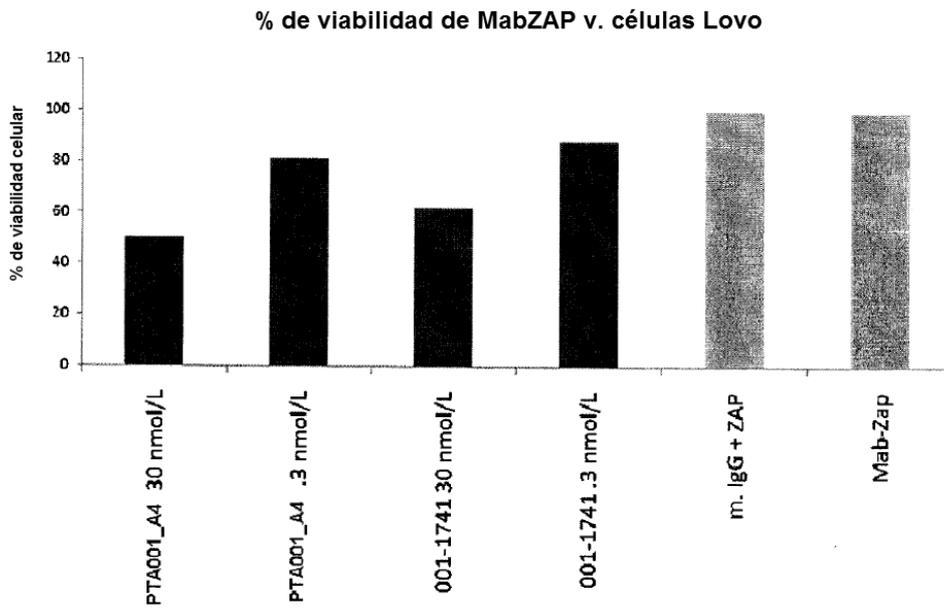


FIG. 35A

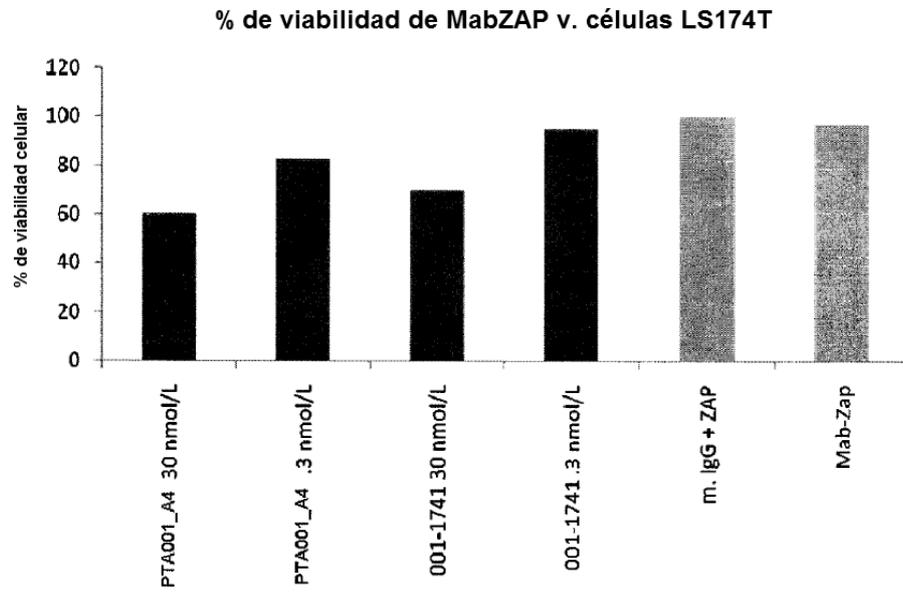


FIG. 35B