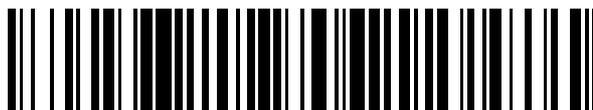


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 856**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.02.2012 PCT/EP2012/053390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12117002**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2012 E 12707732 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2681244**

54 Título: **Anticuerpos CEA**

30 Prioridad:

02.03.2011 EP 11156665

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

07.03.2018

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren , CH**

72 Inventor/es:

**HOFER, THOMAS U.;
HOSSE, RALF;
MOESSNER, EKKEHARD y
UMANA, PABLO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 657 856 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 CEA

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABM). En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes que se unen al antígeno carcinoembrionario humano (CEA).

10 **Antecedentes****Antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpos anti-CEA**

15 El antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CEACAM-5 o CD66e) es una glicoproteína que tiene una masa molecular de aproximadamente 180 kDa. El CEA es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y contiene siete dominios que se unen a la membrana celular a través de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Thompson JA, J Clin Lab Anal. 5:344–366, 1991). Los siete dominios incluyen un solo dominio variable de Ig N-terminal y seis dominios (A1-B1-A2-B2-A3-B3) homólogos al dominio constante de Ig (Hefta L J, et al., Cancer Res. 52:5647-5655, 1992).

20 La familia del CEA humano contiene 29 genes, de los cuales se expresan 18: 7 pertenecientes al subgrupo CEA y 11 al subgrupo de glicoproteínas específicas del embarazo. Se cree que varios miembros del subgrupo de CEA poseen propiedades de adhesión celular. Se cree que el CEA desempeña un papel en la inmunidad innata (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). Debido a la existencia de proteínas estrechamente relacionadas con el CEA, puede ser un desafío aumentar los anticuerpos anti-CEA que son específicos para el CEA con una mínima reactividad cruzada con las otras proteínas estrechamente relacionadas.

30 El CEA se ha identificado durante mucho tiempo como un antígeno asociado a tumores (Gold y Freedman, J Exp Med., 121:439–462, 1965; Berinstein N.L., J Clin Oncol., 20:2197–2207, 2002). Originalmente clasificado como una proteína expresada solo en tejido fetal, el CEA se ha identificado ahora en varios tejidos adultos normales. Estos tejidos son principalmente de origen epitelial, incluidas las células del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, y las células de colon, cuello uterino, glándulas sudoríparas y próstata (Nap et al., Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988; Nap et al., Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992).

35 Los tumores de origen epitelial, así como sus metástasis, contienen el CEA como un antígeno asociado a un tumor. Si bien la presencia de CEA en sí no indica la transformación a una célula cancerosa, la distribución del CEA es indicativa. En tejido normal, el CEA generalmente se expresa en la superficie apical de la célula (Hammarstrom S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)), haciéndolo inaccesible para el anticuerpo en el torrente sanguíneo. A diferencia del tejido normal, el CEA tiende a expresarse en toda la superficie de las células cancerosas (Hammarstrom S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). Este cambio en el patrón de expresión hace que el CEA sea accesible para la unión de anticuerpos en células cancerosas. Además, la expresión de CEA aumenta en células cancerosas. Además, la expresión incrementada de CEA promueve un aumento de las adhesiones intercelulares, que pueden dar lugar a metástasis (Marshall J., Semin Oncol., 30(a Suppl. 8):30-6, 2003).

45 El CEA se escinde fácilmente de la superficie de la célula y se disemina al torrente sanguíneo desde los tumores, directamente o a través del sistema linfático. Debido a esta propiedad, el nivel de CEA en suero se ha utilizado como un marcador clínico para el diagnóstico de cánceres y las pruebas de detección de la recurrencia de cánceres, particularmente el cáncer colorrectal (Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992; Chau I., et al., J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004; Flamini et al., Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006). Esta propiedad también supone uno de los desafíos para usar el CEA como una diana, ya que el CEA en suero se une a la mayoría de los anticuerpos anti-CEA actualmente disponibles, impidiéndoles alcanzar su diana en la superficie celular y limitando los posibles efectos clínicos.

55 Se han generado múltiples anticuerpos monoclonales contra el CEA con fines de investigación, como herramientas de diagnóstico y para fines terapéuticos (por ejemplo, Nap et al., Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992; Sheahan et al., Am. J. Clin. Path. 94:157-164, 1990; Sakurai et al., J. Surg. Oncol., 42:39-46, 1989; Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992; Ledermann J A, Br. J. Cancer, 58:654, 1988; Ledermann J A, Br. J. Cancer, 68:69-73, 1993; Pedley R B, et al., Br. J. Cancer, 68:69-73, 1993; Boxer GM, et al., Br. J. Cancer, 65:825-831, 1992). Chester et al. han aislado un anticuerpo anti-CEA monocatenario a partir de una biblioteca de presentación en fagos para su uso en radioinmunodetección y radioinmunoterapia (patente de EE. UU. n.º 5.876.691) y, posteriormente, han humanizado el anticuerpo (patente de EE. UU. n.º 7.232.888). Los anticuerpos anti-CEA también se han aislado a partir de bibliotecas de presentación en fagos humanos (patente de EE. UU. n.º 5.872.215).

65 El anticuerpo monoclonal de ratón PR1A3 se generó por fusión de células de mieloma NS1 (P3/NS1/I-Ag-4-1) con células de bazo de ratones inmunizados con epitelio colorrectal normal (Richman P. I. y Bodmer W. F., Int. J. Cancer, 39:317-328, 1987). El PR1A3 reacciona fuertemente a carcinomas colorrectales bien diferenciados y escasamente

diferenciados y tiene ventajas sobre otros anticuerpos reactivos al epitelio colorrectal, ya que su antígeno parece fijarse al tumor y no aparece en el sistema linfático ni en ganglios linfáticos normales que drenan un tumor (Granowska M et al., Eur. J. Nucl. Med., 20:690-698, 1989). Por ejemplo, el PR1A3 reaccionó con 59/60 tumores colorrectales (Richman P. I. y Bodmer W. F., Int. J. Cancer, 39:317-328, 1987), mientras que el anticuerpo reactivo contra CEA B72.3 reaccionó con solo el 75 % de los tumores colorrectales (Mansi L., et al., Int J Rad Appl Instrum B., 16(2):127-35, 1989).

El mapeo de epítomos de PR1A3 muestra que el anticuerpo se dirige al dominio B3 y al anclaje de GPI de la molécula de CEA (Durbin H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4313-4317, 1994). En consecuencia, el anticuerpo PR1A3 se une solo al CEA unido a la membrana, y no a la forma soluble de CEA que se puede encontrar en el torrente sanguíneo de los pacientes con cáncer. Debido a esta propiedad de unión, es poco probable que el anticuerpo PR1A3 sea secuestrado por el CEA sérico; en cambio, puede dirigirse al CEA expresado en células cancerosas. El epítomo unido por PR1A3 es un epítomo conformacional, no un epítomo lineal, lo que se cree que contribuye a la pérdida de unión de PR1A3 al CEA soluble (Stewart et al., Cancer Immunol Immunother, 47:299-06, 1999).

El anticuerpo PR1A3 se humanizó previamente injertando las CDR del anticuerpo original murino en las regiones estructurales 1-3 de la cadena pesada del anticuerpo humano RF-TS3'CL (que retiene la estructura murina 4 de PR1A3) y las regiones estructurales de la cadena ligera del anticuerpo REI. (Stewart et al., Cancer Immunol Immunother, 47:299-06, 1999). Esta versión humanizada de PR1A3 retuvo la especificidad y para el CEA expresado en superficie con una afinidad similar a la del anticuerpo murino (Stewart et al., Cancer Immunol Immunother, 47:299-06, 1999; patente de EE. UU. n.º 5.965.710). Se demostró que un anticuerpo humanizado PR1A3 (hPR1A3) induce la destrucción selectiva de líneas celulares de cáncer colorrectal. (Conaghan P. J., et al., Br. J. Cancer, 98(7):1217-1225). Sin embargo, la afinidad de hPR1A3 por CEA es relativamente baja.

Los anticuerpos anti-CEA radiomarcados se han utilizado en ensayos clínicos en pacientes con cáncer colorrectal. Por ejemplo, se usó un minicuerpo quimérico marcado con ¹²³I, T84.66 (cT84.66), en un estudio clínico piloto en pacientes con cáncer colorrectal. El minicuerpo radiomarcado fue capaz de dirigirse a las células cancerosas. (Wong J. Y. et al., Clin Cancer Res. 10(15):5014-21, (2004)). En otro ejemplo, el labetuzumab marcado con ¹³¹I, un anticuerpo anti-CEA humanizado radiomarcado, se sometió a prueba en radioinmunoterapia adyuvante en pacientes con metástasis hepáticas del cáncer colorrectal, y se observó que proporcionaba una ventaja prometedoras en la supervivencia. (Liersch T., et al., Ann. Surg. Oncol. 14(9):2577-90, (2007)).

Glicosilación de anticuerpos

El componente oligosacárido puede afectar de modo significativo a las propiedades relevantes para la eficacia de una glicoproteína terapéutica, incluidas la estabilidad física, la resistencia al ataque de las proteasas, las interacciones con el sistema inmunitario, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no solo de la presencia o ausencia de los oligosacáridos, sino también de sus estructuras específicas. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de los oligosacáridos y la función de las glicoproteínas. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacárido median en la rápida eliminación de la glicoproteína del torrente sanguíneo gracias a las interacciones con proteínas que se unen a carbohidratos específicos, mientras que otras se pueden unir a anticuerpos y desencadenar reacciones inmunitarias no deseadas. (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81, 1996).

Las células de mamífero han sido los hospedadores preferentes para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glicosilar proteínas de la forma más compatible para la aplicación humana (Cumming et al., Glycobiology 1:115-30, 1991; Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-981, 1996). Las bacterias muy raramente glicosilan proteínas y, al igual que otros tipos de hospedadores frecuentes, por ejemplo levaduras, hongos filamentosos, células de insectos y plantas, dan lugar a patrones de glicosilación asociados a la rápida eliminación del torrente sanguíneo, a interacciones inmunitarias no deseadas y, en algunos casos concretos, a una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las que más se han utilizado durante los dos últimos decenios son las células de ovario de hámster chino (CHO). Además de dar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación sistemática de líneas celulares clónicas muy productivas y genéticamente estables. Se pueden cultivar a densidades elevadas en biorreactores simples empleando medios sin suero y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales empleadas habitualmente son las células de riñón de cría de hámster (BHK), las células de mieloma de ratón NS0 y SP2/0. En fechas más recientes se ha sometido a prueba también la producción a partir de animales transgénicos (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81, 1996).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas de las regiones constantes de la cadena pesada, en las que cada isotipo posee un ordenamiento distinto de estructuras de carbohidrato unido por enlaces *N*-glicosídicos, lo cual afecta de modo variable el ensamblaje, la secreción o la actividad funcional de la proteína (Wright A. y Morrison S. L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997). La estructura del carbohidrato unido por enlaces *N*-glicosídicos varía de forma considerable, dependiendo del grado de procesamiento y puede incluir oligosacáridos de alto contenido en manosa, con ramificaciones múltiples, así como oligosacáridos complejos biantenarios. (Wright, A., y Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997). Típicamente, existe un procesamiento heterogéneo de las estructuras básicas de oligosacárido unidas en un sitio particular de glicosilación, de modo que incluso los anticuerpos monoclonales existen como una población de glicofomas múltiples. De igual manera, se ha demostrado que se

producen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre líneas celulares, e incluso se han observado diferencias menores en una línea celular determinada que se haya cultivado en condiciones diferentes (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5(8):813-22, 1995).

5 Una manera de obtener importantes incrementos de potencia, manteniendo un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios indeseables significativos consiste en potenciar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales mediante modificación por ingeniería genética de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más utilizados en la inmunoterapia contra el
10 cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación unido por enlaces *N*-glicosídicos conservado en el Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

Umaña et al. demostraron previamente que la sobreexpresión de $\beta(1,4)$ -*N*-acetilglucosaminiltransferasa III («GnTIII»), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, en células de ovario de hámster chino (CHO) aumenta significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO modificadas por ingeniería genética. (Véase Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999); y Publicación Internacional n.º WO 99/54342). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de mAb no conjugados que tienen una gran afinidad y especificidad por tumores, pero tienen una potencia insuficiente para ser útiles clínicamente cuando se producen en líneas celulares industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Ese estudio fue
20 el primero en demostrar que se podrían obtener grandes aumentos en la actividad de ADCC mediante modificación genética de las células productoras de anticuerpos para expresar GnTIII, lo que dio lugar también a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos bisectados no fucosilados, por encima de los niveles encontrados en anticuerpos naturales.

30 Sigue existiendo una necesidad de estrategias terapéuticas mejoradas dirigidas al CEA, en particular, el CEA unido a membrana para el tratamiento de cánceres.

Breve resumen de la invención

35 Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une al CEA unido a membrana, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, la CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 y la CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 223, y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 39, la CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 49 y la CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 56 .

40 En un modo de realización, el anticuerpo se une al CEA unido a membrana con una Kd de 100 nM o inferior. En un modo de realización, el anticuerpo se une al CEA unido a membrana con una Kd de 10 nM o inferior. En un modo de realización, el anticuerpo se une al CEA unido a membrana con una Kd de 1 nM o inferior.

45 En un modo de realización adicional, el anticuerpo comprende los residuos estructurales de CH1A1A (SEQ ID NO: 261) o CH1A1B (SEQ ID NO: 262). En un modo de realización, la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 239 y SEQ ID NO: 247 y la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 209.

50 En ciertos modos de realización, el anticuerpo de los modos de realización anteriores se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3, o es capaz de competir por su unión con el mismo.

En un modo de realización, el anticuerpo comprende una región Fc que ha sido modificada por glicoingeniería. En un modo de realización, al menos del 20 % al 100 % de los oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos de la región
55 Fc modificada por glicoingeniería no están fucosilados. En un modo de realización, al menos del 20 % al 100 % de los oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos de la región Fc modificada por glicoingeniería son bisectados. En un modo de realización, al menos del 20 % al 50% de los oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos de la región Fc modificada por glicoingeniería son bisectados y no están fucosilados. En un modo de realización, el anticuerpo que comprende la región Fc modificada por glicoingeniería tiene al menos una función efectora aumentada. En un modo
60 de realización, la función efectora aumentada se selecciona del grupo que consiste en aumento de la afinidad de unión al receptor Fc, aumento de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, transducción de señales directa que induce apoptosis, aumento de la maduración de células dendríticas y aumento de la activación de linfocitos T. En un modo de realización, el anticuerpo que comprende la
65 región Fc modificada por glicoingeniería tiene un aumento de la ADCC de al menos el 40 % al 100 % en comparación con la molécula de unión al antígeno original no modificada por glicoingeniería.

Otro aspecto de la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente. Otro aspecto de la invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido que codifica el anticuerpo de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente. Otro aspecto de la invención proporciona una célula hospedadora que comprende este vector.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención proporciona el anticuerpo o la composición de cualquiera de los modos de realización descritos anteriormente para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa el CEA de forma anormal. En un modo de realización, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer gástrico, cáncer de páncreas o cáncer de mama.

En ciertos modos de realización, el anticuerpo o la composición se administran en combinación con quimioterapia o radioterapia.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra un diagrama esquemático del antígeno CEA (CEACAM-5, CD66e). El anticuerpo PR1A3 se une específicamente al dominio B3 del antígeno cuando se une a la membrana celular.

La FIGURA 2 muestra la actividad potenciada de ADCC de un anticuerpo PR1A3 quimérico modificado por glicoingeniería en comparación con un anticuerpo PR1A3 quimérico no modificado por glicoingeniería con PBMC humanas como efectores.

La FIGURA 3 muestra la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende una construcción de región variable de cadena pesada, CH7A, y una construcción de región variable de cadena ligera, CL1A, en comparación con el anticuerpo PR1A3 quimérico.

La FIGURA 4 muestra los sitios de aleatorización para generar una biblioteca de anticuerpos para la maduración de la afinidad de la cadena ligera del anticuerpo PR1A3 humanizado. Las posiciones marcadas con una X fueron aleatorizadas.

La FIGURA 5 muestra los sitios de aleatorización para generar una biblioteca de anticuerpos para la maduración de la afinidad de la cadena pesada del anticuerpo PR1A3 humanizado. Las posiciones marcadas con una X fueron aleatorizadas.

La FIGURA 6 muestra la actividad de unión de anticuerpos anti-CEA con afinidad madurada derivados de un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende una construcción de región variable de cadena pesada CH7ArF9 y una construcción de región variable de cadena ligera CL1ArH11.

La FIGURA 7 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg a los que se administraron intraesplénicamente células de carcinoma colorrectal humano LS174T para tener un modelo de tumor ortotópico. El tratamiento con anticuerpos se inició siete días más tarde mediante la inyección de los anticuerpos en una dosis de 25 mg/kg de peso corporal, seguido de dos inyecciones semanales adicionales. «CH7A» representa un anticuerpo humanizado que comprende las CDR de PR1A3 como se describe en el presente documento. «SM3E» se refiere a un anticuerpo anti-CEA generado previamente. «GA201» representa un anticuerpo anti-EGF humanizado usado como control positivo. «PBS» se refiere a solución salina tamponada con fosfato, que se usó como control negativo. La supervivencia se midió de acuerdo con los criterios de sacrificio definidos por la autoridad reguladora suiza.

La FIGURA 8 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg a los que se inyectó por vía intravenosa células de carcinoma de pulmón A549, injertándose el tumor en el pulmón de los animales. El tratamiento con anticuerpos se inició siete días más tarde mediante la inyección de los anticuerpos en una dosis de 25 mg/kg de peso corporal, seguido de dos inyecciones semanales adicionales. «CH7A», «SM3E» y «GA201» son los establecidos para la figura 7, anteriormente. La designación «CH7ArF9 CL1ArH11» representa una variante de anticuerpo CH7A con cadenas pesadas y ligeras con afinidad madurada. La designación «ge» indica que el anticuerpo se ha modificado por glicoingeniería para tener números reducidos de oligosacáridos fucosilados en la región Fc. «Vehículo» se refiere al control negativo. Las células de carcinoma de pulmón A549 son fuertemente positivas para la expresión de EGFR y débilmente positivas para la expresión de CEA.

La FIGURA 9 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg a los que se administró intraesplénicamente células de carcinoma gástrico MKN45, que generan metástasis tumorales en el hígado de los animales. Las designaciones «CH7ArF9 CL1A rH11», «SM3E», «ge» y «PBS» son las establecidas para las figuras 7 y 8 anteriores.

- 5 La FIGURA 10 muestra el análisis cinético de clones con afinidad madurada: (a) muestra un sensograma de Fab anti-CEA con CH7A H4E9 de cadena pesada con afinidad madurada (SEQ ID NO: 199) junto con CL1A de cadena ligera sin maduración (SEQ ID NO: 105); un CL1A pAC18 de cadena ligera con afinidad madurada (SEQ ID NO: 209) combinado con CH7A de cadena pesada sin maduración; y una combinación de los mismos, CH7A H4E9 y CL1A pAC18 (SEQ ID NO: 199 y 209); (b) resumen del análisis cinético de clones con afinidad madurada.
- La FIGURA 11 muestra una descripción esquemática de la estrategia de PCR para la aleatorización de CDR1 y CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-CEA CH7A humanizado.
- 10 La FIGURA 12 muestra una descripción esquemática de la estrategia de PCR para la aleatorización de CDR1 y CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-CEA CL1A humanizado.
- La FIGURA 13 muestra una descripción esquemática de la estrategia de PCR para la aleatorización de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-CEA CH7A humanizado.
- 15 La FIGURA 14 muestra una descripción esquemática de la estrategia de PCR para la aleatorización de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-CEA CL1A humanizado.
- La FIGURA 15 muestra la afinidad de unión de anticuerpos anti-CEA por el CEA unido a membrana en células diana MKN45. Anticuerpos anti-CEA humanizados con una cadena ligera con afinidad madurada (Panel A, CH7A, CL1ArH7 o CH7A, CL1ArH11) o cadenas ligeras y pesadas con afinidad madurada (Panel B, CH7A rB9, CL1A rH11 G2(1)) que se han convertido en IgG muestran una unión mejorada en comparación con el anticuerpo de control (CH7A, CL1A).
- 20 La FIGURA 16 muestra los resultados de un ensayo que analiza la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de anticuerpos con afinidad madurada (CH7ArB9, CL1ArH11G2(1), CH7Arf9, CL1ArH11G2(1) y CH7A, CL1A rH11 G2(1)) en comparación con anticuerpos de control (CH7A, CL1A G2(R2)).
- 25 La FIGURA 17 muestra los resultados de un ensayo de unión celular para el anticuerpo anti-CEA con CH1A de cadena pesada en comparación con el anticuerpo quimérico murino-humano chPR1A3.
- 30 La FIGURA 18 muestra los resultados de un ensayo de unión para anticuerpos anti-CEA con CH1A1, CH1A2, CH1A3 o CH1A4 de cadena pesada y 2F1 de cadena ligera.
- La FIGURA 19 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad para anticuerpos anti-CEA con CH1A1, CH1A2, CH1A3 o CH1A4 de cadena pesada.
- 35 La FIGURA 20 muestra el resultado del análisis por resonancia de plasmones superficiales (SPR) para anticuerpos anti-CEA generados a partir de CH1A1.
- 40 La FIGURA 21 muestra el resultado de los ensayos de unión celular para anticuerpos anti-CEA generados a partir de CH1A1.
- La FIGURA 22 muestra las mediciones por resonancia de plasmones superficiales (SPR) de la afinidad (medida en la forma bivalente) de anticuerpos anti-CEA modificados por ingeniería genética para proporcionar estabilidad en comparación con la cadena pesada de 5HFF12 original.
- 45 Las FIGURAS 23 y 24 muestran los resultados de un ensayo de estabilidad para el anticuerpo 5HFF12 con afinidad madurada en comparación con su CH7A de cadena pesada original con las mutaciones puntuales individuales introducidas que se seleccionaron en 5HFF12.
- 50 La FIGURA 25 muestra el análisis por resonancia de plasmones superficiales de la estructura combinada y las variantes de CDR-H3.
- La FIGURA 26 muestra la actividad de ADCC de las variantes estructurales basadas en CHA1A.
- 55 La FIGURA 27 muestra la actividad de ADCC de las variantes estructurales basadas en CHA1A.
- La FIGURA 28 muestra la actividad de ADCC de la estructura combinada y las variantes de CDR-H3.
- 60 La FIGURA 29 muestra la actividad de ADCC de la estructura combinada y las variantes de CDR-H3.
- La FIGURA 30 muestra la eficacia del anticuerpo anti-CEA modificado por glicoingeniería CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1 en un modelo de xenoinjerto de carcinoma colorrectal en ratones SCID transgénicos para CD16 humano.
- 65 La FIGURA 31 muestra la eficacia del anticuerpo anti-CEA modificado por glicoingeniería CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1 en un modelo de xenoinjerto de carcinoma pulmonar A549 en ratones SCID transgénicos para CD16 humano.

La FIGURA 32 muestra las secuencias de aminoácidos de las CDR para diversas ABM anti-CEA.

5 La FIGURA 33 muestra las secuencias de aminoácidos de las construcciones de cadena ligera para diversas ABM anti-CEA.

La FIGURA 34A-C muestra las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera con afinidad madurada y las afinidades de unión asociadas.

10 La FIGURA 35 muestra las constantes de afinidad de las diversas secuencias de anticuerpo con afinidad madurada.

La FIGURA 36 muestra las secuencias de aminoácidos de CHR-H3 para diversas ABM anti-CEA.

15 La FIGURA 37A-C muestra las secuencias de aminoácidos de regiones VH de diversas ABM anti-CEA.

La FIGURA 38 muestra las alineaciones de la secuencia de aminoácidos de las regiones VH de diversos anticuerpos anti-CEA madurados en estabilidad.

20 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento como se usan generalmente en la técnica, a menos que se defina lo contrario a continuación.

25 Como se usa en el presente documento, el término «molécula de unión a antígeno» se refiere, en su sentido más amplio, a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Un ejemplo no limitante de una molécula de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento del mismo que conserva la unión específica a un antígeno. Más específicamente, como se usa en el presente documento, una molécula de unión a antígeno que se une al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana es una ABM que se une específicamente al CEA, más particularmente al CEA de superficie celular o unido a membrana. Por «se une específicamente» se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas.

35 Como se usa en el presente documento, el término «anticuerpo» pretende incluir moléculas de anticuerpo completas, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpos que tienen una región Fc y que conservan la especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen un región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que conservan la especificidad de unión. También se engloban fragmentos de anticuerpos que conservan la especificidad de unión, incluyendo, sin limitación, fragmentos VH, fragmentos VL, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos (véase, por ejemplo, Hudson y Souriau, Nature Med. 9. 129-134 (2003)).

45 Como se usa en el presente documento, el término «dominio de unión a antígeno» se refiere a la parte de una molécula de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente a un antígeno y es complementaria a parte o la totalidad del mismo. Cuando un antígeno es grande, una molécula de unión a antígeno solo puede unirse a una parte particular del antígeno, denominándose epítipo a dicha parte. Puede proporcionarse un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables de un anticuerpo. Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo.

50 Como se usa en el presente documento, el término «afinidad madurada» en el contexto de moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) se refiere a una molécula de unión a antígeno que se deriva de una molécula de unión de antígeno de referencia, por ejemplo, por mutación, se une al mismo antígeno, preferentemente se une al mismo epítipo, que el anticuerpo de referencia; y tiene una mayor afinidad por el antígeno que la molécula de unión al antígeno de referencia. La maduración de la afinidad generalmente implica la modificación de uno o más residuos de aminoácidos en una o más CDR de la molécula de unión a antígeno. Típicamente, la molécula de unión a antígeno con afinidad madurada se une al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno de referencia inicial.

60 Como se usa en el presente documento, la «afinidad de unión» generalmente se expresa en términos de constantes de asociación o disociación en equilibrio (K_a o K_d , respectivamente), que a su vez son proporciones recíprocas de constantes de la velocidad de disociación y asociación (k_d y k_a , respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de la velocidad permanezca igual.

65 Como se usa en el presente documento, el término «región Fc» se refiere a una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG podrían variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para que se expanda desde el residuo aminoácido

en la posición Cys226 al extremo carboxílico.

Como se usa en el presente documento, el término «región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina» pretende incluir variantes alélicas de origen natural de la región Fc de una inmunoglobulina, así como variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar en funciones efectoras (tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden eliminarse del extremo N o del extremo C de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes se pueden seleccionar de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica para tener un efecto mínimo sobre la actividad. (Véase, por ejemplo, Bowie, J. U. et al., *Science* 247:1306-10 (1990).

Como se usa en el presente documento, el término «CEA humano unido a membrana» se refiere al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) que se une a una parte de la membrana de una célula o a la superficie de una célula, en particular, la superficie de una célula tumoral. El término «CEA humano unido a membrana» puede, en ciertas circunstancias, referirse a un CEA que no se une a la membrana de una célula, pero que se ha construido para preservar el epítipo al que se une el anticuerpo PR1A3. El término «CEA soluble» se refiere al antígeno carcinoembrionario humano que no se une o que se escinde de una membrana celular o superficie celular (por ejemplo, la superficie de una célula tumoral) y/o que, típicamente, no conserva el epítipo de conformación que se une por el anticuerpo PR1A3. El CEA soluble puede, por ejemplo, encontrarse en el torrente sanguíneo o el sistema linfático de un sujeto con cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término «sin reactividad cruzada sustancial contra el CEA soluble» significa que una molécula (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno) no reconoce o no se une específicamente al CEA soluble, particularmente cuando se compara con el CEA unido a membrana. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno puede unirse a de menos de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 5 % del CEA soluble, o puede unirse al CEA soluble en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en menos de aproximadamente un 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 % o 0,1 %, preferentemente menos de aproximadamente un 2 %, 1 % o 0,5 % del CEA soluble, y lo más preferentemente a menos de aproximadamente un 0,2 % o 0,1 % del CEA soluble.

Como se usa en el presente documento, los términos «fusión» y «quimérico», cuando se usan en referencia a polipéptidos tales como ABM, se refieren a polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de dos o más polipéptidos heterólogos, tales como partes de anticuerpos de diferentes especies. Para las ABM quiméricas, por ejemplo, los componentes que no se unen al antígeno pueden derivarse de una amplia variedad de especies, incluyendo primates tales como chimpancés y humanos. La región constante de la ABM quimérica es, en general, sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico generalmente comprende una secuencia que se deriva de un anticuerpo anti-CEA recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de PR1A3 murino. Los anticuerpos humanizados son una forma particularmente preferente de anticuerpo de fusión o quimérico.

Como se usa en el presente documento, el término «humanizado» se usa para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada en parte de una molécula de unión a antígeno no humana, por ejemplo, un anticuerpo murino, que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión a antígeno de la molécula original, pero que es menos inmunogénica en los seres humanos. Esto puede lograrse mediante diversos métodos (denominados en el presente documento «humanización»), que incluyen, sin limitación, (a) injertar los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar únicamente las CDR no humanas (por ejemplo, molécula de unión a antígeno del donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, molécula de unión a antígeno del receptor) con o sin conservación de residuos estructurales críticos (por ejemplo, aquellos que son importantes para conservar una buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpos), o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero «cubriéndolos» con una sección de tipo humano por reemplazo de residuos superficiales. Dichos métodos se describen en Jones et al., *Morrison et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855 (1984); *Morrison y Oi*, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); *Verhoeyen et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); *Padlan*, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); *Padlan*, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994). En general, hay 3 regiones determinantes de la complementariedad, o CDR, (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, que están flanqueados por cuatro subregiones estructurales (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Se puede encontrar un análisis sobre anticuerpos humanizados, entre otros, en la patente de EE. UU. n.º 6.632.927 y en la solicitud de EE. UU. publicada n.º 2003/0175269. La humanización también se puede lograr trasplantando CDR truncadas que contienen solo los residuos de aminoácido determinantes de la especificidad para la CDR dada en una estructura elegida. Por «residuos determinantes de la especificidad» se entienden aquellos residuos que están directamente implicados en la interacción específica con el antígeno y/o que son necesarios para la unión específica a antígeno. En general, solo alrededor de una quinta a una tercera parte de los residuos en una CDR dada intervienen en la unión al antígeno. Los residuos determinantes de la especificidad de una CDR particular pueden identificarse, por ejemplo, mediante el cálculo de contactos interatómicos a partir de modelado tridimensional y la determinación de la variabilidad de secuencia en una posición de residuo dada de acuerdo con los procedimientos descritos en *Padlan et al.*, *FASEB J.* 9(1):133-139 (1995).

En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, las moléculas de unión a antígeno humanizadas pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor ni en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar adicionalmente el rendimiento de la molécula de unión a antígeno. En general, la molécula de unión a antígeno humanizada comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que al menos una, o sustancialmente todas, o todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. La molécula de unión a antígeno humanizada opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

De manera similar, como se usa en el presente documento, el término «primatizado» se usa para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada de una molécula de unión a antígeno no de primate, por ejemplo, un anticuerpo murino que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión a antígeno de la molécula original pero que es menos inmunogénica en los primates.

Como se usa en el presente documento, el término polinucleótido o polipéptido «variante» (o análogo) se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido expresado específicamente en inserciones, deleciones y sustituciones creadas usando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante. Específicamente, las variantes recombinantes que codifican estos polipéptidos iguales o similares se pueden sintetizar o seleccionar haciendo uso de la «redundancia» en el código genético. Se pueden introducir diversas sustituciones de codones, tales como los cambios silenciosos que producen diversos sitios de restricción, para optimizar la clonación en un vector plasmídico o vírico o la expresión en un sistema particular procariota o eucariota. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótido pueden reflejarse en el polipéptido o en dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como las afinidades de unión a ligandos, las afinidades entre cadenas o la tasa de degradación/renovación.

Como se usa en el presente documento, el término «molécula de unión a antígeno anti-CEA variante» se refiere a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno anti-CEA «original» en virtud de la adición, deleción y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo original. En un modo de realización específico, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables o en CDR de la cadena pesada y/o ligera de la molécula de unión a antígeno original. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos uno, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez (es decir, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables o CDR (es decir, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 regiones hipervariables o CDR) de la molécula de unión a antígeno original. Una variante de la molécula de unión a antígeno anti-CEA también puede comprender una o más adiciones, deleciones y/o sustituciones en una o más regiones estructurales de la cadena pesada o ligera. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tenga al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de dominio variable de cadena pesada o ligera de la molécula de unión a antígeno original, típicamente al menos aproximadamente un 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. La identidad con respecto a una secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo original, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. No se debe realizar ninguna de las inserciones, deleciones o extensiones internas, en el extremo C o en el extremo N en la secuencia de anticuerpo de modo que afecten a la identidad u homología de secuencia. La molécula de unión a antígeno variante conserva la capacidad de unirse al CEA humano unido a membrana. En un modo de realización, la ABM anti-CEA se une al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno original. En un modo de realización, la ABM anti-CEA compite por la unión al CEA humano unido a membrana con la molécula de unión a antígeno original. En un modo de realización, la ABM anti-CEA se une al CEA humano unido a la membrana y no se une al CEA humano soluble. La ABM anti-CEA tiene propiedades que son superiores a las de la molécula de unión a antígeno original. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, mayor estabilidad y/o capacidad potenciada para inducir citotoxicidad celular mediada por anticuerpos *in vitro* e *in vivo*. En un modo de realización, la ABM anti-CEA tiene mayor estabilidad y conserva o tiene mejor afinidad de unión por el CEA unido a membrana y conserva o tiene una capacidad mejorada para inducir citotoxicidad celular mediada por anticuerpos *in vitro* e *in vivo*.

Para analizar dichas propiedades, generalmente se debe comparar una molécula de unión a antígeno variante y la molécula de unión a antígeno original en el mismo formato; por ejemplo, una forma Fab de la molécula de unión a antígeno variante con una forma Fab de la molécula de unión a antígeno original o una forma de longitud completa de la molécula de unión a antígeno variante con una forma de longitud completa de la molécula de unión a antígeno original. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante tiene una mejora de al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces o 20 veces en la actividad

biológica cuando se compara con la molécula de unión a antígeno original. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante es una variante modificada por ingeniería genética para proporcionar estabilidad que tiene mayor estabilidad en comparación con la molécula de unión a antígeno original. La estabilidad puede analizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica y mediante los procedimientos descritos en el presente documento, específicamente en los ejemplos 3-6. En modos de realización específicos, la molécula de unión a antígeno variante tiene al menos una estabilidad aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces superior en comparación con la molécula de unión a antígeno original.

En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno variante presenta un incremento en la estabilidad que se mide como un cambio en el parámetro de estabilidad en comparación con la molécula de unión a antígeno original. En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno variante tiene un cambio de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces en un parámetro de estabilidad en comparación con la unión a antígeno original. Un parámetro de estabilidad es, por ejemplo, la temperatura a la que se despliega o desnatura la molécula de unión a antígeno variante, la presión a la que se despliega o desnatura la molécula de unión a antígeno variante, o el tiempo requerido para desnaturar o desplegar la molécula de unión a antígeno variante en condiciones diseñadas para hacer que la molécula de unión a antígeno variante se vuelva inestable. En un modo de realización, el incremento en la estabilidad se determina mediante un ensayo de desnaturalización térmica, por ejemplo, mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC). En un modo de realización, el incremento en la estabilidad se determina mediante un ensayo de desnaturalización química. En un modo de realización, el incremento en la estabilidad se determina mediante un ensayo de alta presión. En otro modo de realización, la estabilidad de la molécula de unión a antígeno variante se determina usando un ensayo por polarización de fluorescencia. En un modo de realización, la estabilidad de la molécula de unión a antígeno variante se determina usando un ensayo de dispersión dinámica de la luz (DLS). (Véanse los ejemplos y, por ejemplo, Nobbmann, U. et al., *Biotech. Genetic Eng. Rev.* 24:117-128 (2007)). La DLS monitoriza la integridad de una molécula, tal como un anticuerpo, en la que, en general, un aumento de la dispersión de la luz indica el despliegue o la desnaturalización de la proteína. La DLS de las moléculas se puede examinar como una función de la temperatura o desnaturantes químicos para comparar estabilidades relativas. Las moléculas que permanecen en su conformación natural (poco o ningún aumento en las propiedades de DLS) se consideran estables en las condiciones de ensayo. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante es estable a una temperatura que es al menos 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 grados Celsius más alta que la de la ABM original, u otra molécula de referencia apropiada, cuando se analiza usando un ensayo de dispersión dinámica de la luz. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante es estable a 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 grados Celsius o más. La estabilidad térmica se puede medir, por ejemplo, usando DLS, DSC o polarización de fluorescencia. En un modo de realización, la estabilidad térmica de la molécula de unión a antígeno variante se mide usando DLS. En un modo de realización, el ensayo de DLS se realiza usando 1 mg/ml de la ABM o ABM variante en un tampón de histidina 20 mM y NaCl 140 mM a pH 6,0. El ensayo de DLS se lleva a cabo empezando en 25 °C con un aumento incremental de la temperatura de 0,05 °C/min.

El término molécula de unión a antígeno «original» se refiere a una ABM que se usa como punto de partida o base para la preparación de la variante. En un modo de realización específico, la molécula de unión a antígeno original tiene una región estructural humana y, si está presente, tiene una región o regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo original puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

Las «sustituciones» de aminoácidos pueden dar como resultado la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos «conservadoras» se pueden realizar, por ejemplo, tomando como base la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las «inserciones» o «deleciones» generalmente están en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 aminoácidos, más específicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 aminoácidos, y aún más específicamente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 aminoácidos. Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos también pueden dar como resultado la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con diferentes propiedades estructurales y/o químicas, por ejemplo, reemplazando un aminoácido de un grupo (por ejemplo, polar) por otro aminoácido de un grupo diferente (por ejemplo, básico). La variación permitida se puede determinar experimentalmente mediante la realización sistemática de inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en una molécula polipeptídica usando técnicas de ADN recombinante y analizando la actividad de las variantes recombinantes resultantes.

Como se usa en el presente documento, el término «Fv monocatenario» o «scFv» se refiere a un fragmento de

anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL como una única cadena polipeptídica. Típicamente, los dominios VH y VL se unen por una secuencia enlazadora. Véase, por ejemplo, Pluckthun, en: *The PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

Como se usa en el presente documento, el término «minicuerpo» se refiere a un derivado de scFv homodimérico bivalente que contiene una región constante, típicamente la región CH3 de una inmunoglobulina, preferentemente IgG, más preferentemente IgG1, como la región de dimerización. En general, la región constante se conecta al scFv a través de una región de bisagra y/o una región de enlazador. Ejemplos de proteínas de minicuerpos se pueden encontrar en Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56. 3055-61.

Como se usa en el presente documento, el término «diacuerpo» se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y en Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Un triacuerpo se deriva de la formación de un trímero trivalente de tres scFv, que produce tres sitios de unión, y un tetracuerpo es un tetrámero tetravalente de cuatro scFv, que da como resultado cuatro sitios de unión.

En el caso en que haya dos o más definiciones de un término que se usa y/o acepta dentro de la técnica, la definición del término como se usa en el presente documento pretende incluir todos esos significados a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término «región determinante de la complementariedad» («CDR») para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos (también conocidos como regiones de unión a antígeno) presentes dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Las CDR también se denominan «regiones hipervariables» y ese término se usa indistintamente en el presente documento con el término «CDR» en referencia a las partes de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular la han descrito Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983) y Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, se pretende que la aplicación de cualquiera de las dos definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de la misma esté dentro del alcance del término tal como se define y se usa en el presente documento. Los residuos de aminoácidos apropiados que abarcan las CDR como definen cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la tabla 1 a modo de comparación. Los números exactos de residuos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y del tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar rutinariamente qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹La numeración de todas las definiciones de CDR de la tabla 1 es conforme con las convenciones de numeración establecidas por Kabat et al. (véase a continuación).

²«AbM» con una «b» minúscula como se utiliza en la tabla 1 se refiere a las CDR definidas por el programa informático de modelado de anticuerpos «AbM» de Oxford Molecular.

Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de «numeración de Kabat» a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la secuencia misma. Como se usa en el presente documento, «numeración de Kabat» se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest» (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácidos en una ABM con conformes al sistema de numeración de Kabat. Las secuencias del

listado de secuencias (es decir, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 216) no están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, un experto en la técnica está familiarizado con el modo de convertir las secuencias en el Listado de secuencias a la numeración de Kabat.

5 Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica «idéntica» en al menos, por ejemplo, un 95 % a una secuencia nucleotídica de referencia se entiende que la secuencia nucleotídica del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia nucleotídica idéntica al menos en un 95 % a una secuencia nucleotídica de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos de la secuencia de referencia se pueden eliminar o sustituir por otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta un 5 % de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia.

15 Como cuestión práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido en particular es idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia nucleotídica o secuencia polipeptídica descrita en el presente documento, puede determinarse de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un procedimiento para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia de consulta (una secuencia descrita en el presente documento) y una secuencia objeto, también denominado alineación global de secuencias, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo los U en T. El resultado de dicha alineación global de secuencias se da en porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = Unitaria, k-tupla = 4, Penalización por emparejamiento incorrecto = 1, Penalización por unión = 30, Longitud de grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Penalización por espacio = 5, Penalización por tamaño de espacio = 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia nucleotídica objeto, lo que sea más corto.

30 Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a deleciones en las posiciones 5' o 3', no debido a deleciones internas, se debe hacer una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos en las posiciones 5' y 3' de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de consulta que están en las posiciones 5' y 3' de la secuencia objeto, que no se emparejan/alinean, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Si un nucleótido se empareja/alinea, se determina por los resultados de la alineación de secuencia por FASTDB. Este porcentaje se resta a continuación del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación final del porcentaje de identidad. Esta puntuación corregida es la que se utiliza para los propósitos de la presente divulgación. Solo las bases distintas a las bases en las posiciones 5' y 3' de la secuencia objeto, como se muestran mediante la alineación por FASTDB, que no se emparejan/alinean con la secuencia de consulta, se calculan con el propósito de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad.

45 Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea con una secuencia de consulta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las deleciones se producen en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación por FASTDB no muestra un emparejamiento/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no apareadas representan un 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no emparejadas/número total de bases de la secuencia de consulta), por lo que se resta un 10 % a la puntuación del porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes se emparejaran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería de un 90 %. En otro ejemplo se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de consulta de 100 bases. Esta vez, las deleciones son deleciones internas, de modo que no hay bases en los extremos 5' o 3' de la secuencia objeto que no se emparejen/alineen con la secuencia de consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las bases en los extremos 5' y 3' de la secuencia objeto que no se emparejen/alineen con la secuencia problema se corrigen manualmente. No se realizan otras correcciones manuales para los fines de la presente divulgación.

55 Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos «idéntica» en al menos, por ejemplo, un 95 % a una secuencia de aminoácidos de consulta descrita en el presente documento, se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntica a la secuencia de consulta excepto en que la secuencia polipeptídica objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95 % a una secuencia de aminoácidos de consulta, hasta un 5 % de los residuos de aminoácidos de la secuencia objeto se pueden insertar, eliminar o sustituir por otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino o carboxiterminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

65 Como cuestión práctica, si cualquier polipéptido particular es idéntico en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, puede determinarse de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos.

97 %, 98 % o 99 % a un polipéptido de referencia puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos conocidos. Un procedimiento para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia de consulta (una secuencia descrita en el presente documento) y una secuencia objeto, también denominado alineación global de secuencias, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación global de secuencias se da en porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en una alineación de aminoácidos por FASTDB son: Matriz = PAM 0, k-tupla = 2, Penalización por emparejamiento incorrecto = 1, Penalización por unión = 20, Longitud de grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Tamaño de ventana = Longitud de secuencia, Penalización por espacio = 5, Penalización por tamaño de espacio = 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a deleciones en las posiciones N- o C-terminales, no debido a deleciones internas, se debe hacer una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene cuenta los truncamientos en las posiciones N- y C-terminales de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad global. Para secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, con respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia de consulta que están en las posiciones N- y C-terminal de la secuencia objeto, que no se emparejan/alinean con un residuo objeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Si un residuo se empareja/alinea se determina por los resultados de la alineación de secuencia por FASTDB. Este porcentaje se resta a continuación del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación final del porcentaje de identidad. Esta puntuación final del porcentaje de identidad es lo que se utiliza para los propósitos de la presente divulgación. Solo los residuos en los extremos N y C de la secuencia objeto, que no se emparejan/alinean con la secuencia de consulta, se consideran con el propósito de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad. Es decir, solo las posiciones de los residuos de consulta distintas a las de los residuos N y C terminales más alejados de la secuencia objeto.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 residuos aminoácidos se alinea con una secuencia de consulta de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo N de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación por FASTDB no muestra un emparejamiento/alineación de los primeros 10 residuos del extremo N. Los 10 residuos no apareados representan un 10 % de la secuencia (número de residuos en los extremos N y C no emparejados/número total de residuos de la secuencia de consulta), por lo que se resta un 10 % a la puntuación del porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes se emparejaran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería de un 90 %. En otro ejemplo se compara una secuencia objeto de 90 residuos con una secuencia de consulta de 100 residuos. Esta vez, las deleciones son deleciones internas, de modo que no hay residuos en los extremos N o C de la secuencia objeto que no se emparejen/alineen con la secuencia de consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las posiciones de residuos distintas a las de los extremos N y C terminales de la secuencia objeto, tal como se muestran en la alineación por FASTDB, que no se emparejan/alinean con la secuencia de consulta se corrigen manualmente. No se realizarán otras correcciones manuales para los fines de la presente divulgación.

El porcentaje de identidad de polinucleótidos y/o polipéptidos también puede determinarse usando los programas BLAST disponibles a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con los parámetros predeterminados indicados en los programas.

Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico que «hibrida en condiciones rigurosas» con una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento se refiere a un polinucleótido que se hibrida en condiciones específicas, por ejemplo, en una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende formamida al 50 %, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 0,1 × SSC a aproximadamente 65 °C.

Como se usa en el presente documento, el término «polipéptido que tiene actividad GnTIII» se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) en un enlace β-1-4 al manósido unido por enlaces β del núcleo de trimanosilo de oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos. Esto incluye polipéptidos de fusión que presentan actividad enzimática similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de la β(1,4)-*N*-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β-1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-*N*-acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.4.1.144), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), según medición en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de que exista dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la de GnTIII, sino sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con la GnTIII (es decir, el polipéptido candidato presentará una mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad, y lo más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad con respecto a la GnTIII).

Como se usa en el presente documento, el término «dominio de localización de Golgi» se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en Golgi que es responsable de anclar el polipéptido a una ubicación dentro del complejo de Golgi. En general, los dominios de localización comprenden «colas» aminoterminales de una enzima.

Como se usa en el presente documento, el término «funciones efectoras» se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen, sin limitación, afinidad de unión al receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, absorción de antígeno mediada por inmunocomplejos mediante células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de los receptores de la superficie celular, etc.

Como se usa en el presente documento, los términos «modificar, modificado, modificación por ingeniería genética», particularmente con el prefijo «glico-», así como el término «glicoingeniería o ingeniería de glicosilación» se consideran que incluyen cualquier manipulación del patrón de glicosilación de un polipéptido o fragmento del mismo de origen natural o recombinantes. La ingeniería de glicosilación incluye la modificación metabólica de la maquinaria de glicosilación de una célula, incluidas las manipulaciones genéticas de las vías de síntesis de los oligosacáridos para lograr una alteración de la glicosilación de las glicoproteínas expresadas en las células. Además, la ingeniería de glicosilación incluye los efectos de las mutaciones y del entorno celular en la glicosilación. En un modo de realización, la ingeniería de glicosilación es una alteración de la actividad glicosiltransferasa. En un modo de realización particular, la modificación da como resultado una alteración de la actividad glucosaminiltransferasa y/o de la actividad fucosiltransferasa.

Como se usa en el presente documento, el término «célula hospedadora» abarca cualquier clase de sistema celular que puede modificarse por ingeniería genética para generar los polipéptidos y las moléculas de unión a antígeno descritas en el presente documento. En un modo de realización, la célula hospedadora se modifica por ingeniería genética para permitir la producción de una molécula de unión a antígeno con glicofomas modificadas. En un modo de realización preferente, la molécula de unión a antígeno, o molécula de unión a antígeno variante, es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión. En ciertos modos de realización, las células hospedadoras se han manipulado adicionalmente para expresar niveles aumentados de uno o más polipéptidos que tienen actividad GnTIII. Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamíferos, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insectos y células de plantas, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido de planta o animal cultivado.

Como se usa en el presente documento, el término «citotoxicidad celular mediada por Fc» incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión con Fc soluble que contiene una región Fc humana. Es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis de «células diana» por «células efectoras inmunitarias humanas».

Como se usa en el presente documento, el término «células efectoras inmunitarias humanas» se refiere a una población de leucocitos que presentan receptores Fc en sus superficies, a través de los cuales se unen a la región Fc de moléculas de unión a antígeno o de proteínas de fusión con Fc y realizan funciones efectoras. Dicha población puede incluir, sin limitación, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células citolíticas naturales (NK).

Como se usa en el presente documento, el término «células diana» se refiere a células a las que se unen específicamente moléculas de unión a antígeno que comprenden una región Fc (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una región Fc) o proteínas de fusión con Fc. Las moléculas de unión a antígeno o las proteínas de fusión con Fc se unen a las células diana a través de la parte de la proteína que es N-terminal a la región Fc.

Como se usa en el presente documento, el término «citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada» se define como un aumento del número de «células diana» que se lisan en un tiempo dado, a una concentración dada de molécula de unión a antígeno o de proteína de fusión con Fc en el medio que rodea las células diana, por el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc definido anteriormente, y/o una reducción de la concentración de molécula de unión a antígeno o de proteína de fusión con Fc, en el medio que rodea las células diana, requerida para lograr la lisis de un número dado de «células diana», en un tiempo dado, por el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc. El aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc es con respecto a la citotoxicidad celular mediada por la misma molécula de unión a antígeno o proteína de fusión con Fc producida por el mismo tipo de células hospedadoras, usando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento (que son conocidos por los expertos en la técnica), pero que no se ha producido por células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para tener un patrón alterado de glicosilación (por ejemplo, para expresar la glicosiltransferasa GnTIII u otras glicosiltransferasas) por los procedimientos descritos en el presente documento.

Por «molécula de unión a antígeno que tiene una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)» se

entiende una molécula de unión a antígeno, como se ha definido este término en el presente documento, que tiene una ADCC aumentada determinada por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo *in vitro* aceptado de ADCC es el siguiente:

- 5 1) el ensayo utiliza células diana que se sabe que expresan el antígeno diana reconocido por la región del anticuerpo que se une al antígeno;
- 2) el ensayo utiliza, como células efectoras, las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), aisladas de la sangre de un donante sano elegido al azar;
- 10 3) el ensayo se realiza de acuerdo con el protocolo siguiente:
 - 15 i) se aíslan las PBMC aplicando procedimientos estándar de centrifugación por densidad y se suspenden a 5×10^6 células/ml en un medio de cultivo celular RPMI;
 - 20 ii) se cultivan las células diana por procedimientos estándar de cultivo de tejidos, se recolectan de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior a un 90 %, se lavan en un medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 microcurios de ^{51}Cr , se lavan dos veces con medio de cultivo celular y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml;
 - 25 iii) se trasvasan 100 microlitros de la anterior suspensión final de células diana a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos;
 - 30 iv) el anticuerpo se diluye en serie de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa de microtitulación de 96 pocillos, sometiendo a prueba por triplicado varias concentraciones de anticuerpo que abarcan la totalidad del intervalo de concentraciones anterior;
 - 35 v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales de la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2 % (v/v) de un detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis) en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
 - vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pocillos adicionales de la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
 - 40 vii) después se centrifuga la placa de microtitulación de 96 pocillos a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incuba a 4°C durante 1 hora;
 - viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) a cada pocillo, obteniéndose una proporción de células efectoras:diana de 25:1 y se introducen las placas en un incubador en una atmósfera de CO_2 al 5 % a 37°C durante 4 horas;
 - 45 ix) se recoge el sobrenadante sin células de cada pocillo y se cuantifica la radiactividad liberada experimentalmente (ER) empleando un contador gamma;
 - 50 x) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, en la que ER es el promedio de radiactividad cuantificada (véase el punto ix anterior) para dicha concentración de anticuerpo, MR es el promedio de radioactividad cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles MR (véase el punto v anterior) y SR es el promedio de radiactividad cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles SR (véase el punto vi anterior);
- 4) «ADCC aumentada» se define como un incremento en el porcentaje máximo de lisis específica observado en el intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior y/o una reducción en la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada en el intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior. El aumento de ADCC se refiere a la ADCC, medida en el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células hospedadoras, aplicando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no se han producido en células hospedadoras modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar GnTIII.

Moléculas de unión a antígeno, polipéptidos y polinucleótidos anti-CEA

65 El CEA se ha usado durante mucho tiempo como marcador del cáncer para fines de diagnóstico. Se expresa anormalmente (por ejemplo, está sobreexpresado y/o distribuido en un patrón diferente en la célula) en muchos tejidos tumorales en comparación con tejidos no tumorales del mismo tipo de célula. Sin embargo, como el CEA generalmente

se escinde de la superficie de la célula tumoral y la mayoría de los anticuerpos anti-CEA disponibles también se unen al CEA soluble, los anticuerpos no conjugados contra el CEA generalmente no se usan para fines terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CEA que se encuentran actualmente en ensayos piloto se administran como radioconjugados (Wong et al., 2004; Liersch et al., 2007). Varios mecanismos intervienen en la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-CEA, incluida la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). El aumento de la expresión del CEA promueve el aumento de la adhesión intercelular, que puede dar lugar a metástasis de células cancerosas (Marshall J., Semin Oncol. 30(3) Suppl. 8:30-36). Por lo tanto, las moléculas de unión a antígeno anti-CEA también pueden desempeñar un papel en la inhibición de la adhesión celular y la metástasis de células cancerosas mediadas por el CEA.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno variante (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR del anticuerpo PR1A3 murino, en la que al menos una de las CDR tiene sustitución de al menos un residuo de aminoácido en comparación con la correspondiente CDR de PR1A3, y en la que la molécula de unión a antígeno variante tiene una afinidad mejorada por el CEA, preferentemente el CEA unido a membrana en comparación con una molécula de unión a antígeno PR1A3 original. La Solicitud de Patente Internacional WO2011023787 describe moléculas de unión a antígeno anti-CEA con afinidad mejorada por el CEA en comparación con la molécula de unión a antígeno de PR1A3 original.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno variante que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR del anticuerpo PR1A3 murino, en la que al menos una de las CDR tiene una sustitución de al menos un residuo de aminoácido en comparación con la correspondiente CDR de PR1A3, y en la que la molécula de unión a antígeno variante tiene una mayor estabilidad en comparación con una molécula de unión a antígeno PR1A3 original. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno PR1A3 original es una molécula de unión a antígeno PR1A3 humanizada. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno PR1A3 original comprende la región variable de cadena pesada de CH7A (SEQ ID NO: 101). En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno PR1A3 original comprende las regiones variables de cadena pesada CH7A (SEQ ID NO: 101) y la región variable de cadena ligera 2F1 (SEQ ID NO: 209). Dichas una o más CDR pueden ser CDR truncadas y contendrán, como mínimo, los residuos determinantes de la especificidad (SDR), como ese término se define en el presente documento, para una CDR dada. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDR seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 y 217-224 (figura 32 y figura 36), que comprenden los residuos de las CDR que conservarán la unión específica. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 y 217-224, o una variante o forma truncada de la misma que contiene al menos los residuos determinantes de la especificidad para dicha CDR, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En un modo de realización específico, cuando la molécula de unión a antígeno variante comprende una variante de CDR1 de cadena pesada de PR1A3, la HCDR1 tiene una valina sustituida por un glutamato en la posición 31 de Kabat. En un modo de realización específico, cuando la molécula de unión a antígeno variante comprende una variante de CDR3 de cadena pesada de PR1A3, el HCDR3 tiene una tirosina sustituida por una alanina en la posición 98 de Kabat o un aspartato sustituido por una tirosina en la posición 99 de Kabat. En un modo de realización específico, cuando la molécula de unión a antígeno variante comprende una variante de CDR3 de cadena pesada de PR1A3, la HCDR3 tiene una tirosina sustituida por una alanina en la posición 98 de Kabat y un aspartato sustituido por una tirosina en la posición 99 de Kabat.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 217-224 (figura 36) y dos CDR de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10 y 12-24 y/o tres CDR de cadena ligera (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de SEQ ID NO: 36-56, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen al menos los residuos determinantes de la especificidad para cada una de las CDR. En un modo de realización más específico, la molécula de unión a antígeno variante comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 217-224 y dos CDR de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10 y 12-24 y tres CDR de cadena ligera (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de SEQ ID NO: 36-56. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante comprende la región o regiones variables de una cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo, preferentemente una región variable tanto de cadena pesada como ligera. En un modo de realización más particular, la región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera se selecciona de la región variable de cadena pesada y/o ligera seleccionada de SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 y SEQ ID NO: 225-248 (figura 33 y figura 37A-C) o una combinación de las mismas, en la que la región variable de la cadena pesada y ligera no es una combinación de SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 103 o SEQ ID NO: 100 y SEQ ID NO: 104. En algunos modos de realización, la cadena pesada comprende los residuos estructurales de CH1A1A (SEQ ID NO: 261) o CH1A1B (SEQ ID NO: 262) (figura 37C). En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 o SEQ ID NO: 247.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo quimérico, más específicamente,

un anticuerpo humanizado. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante comprende una región Fc. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante tiene afinidad madurada. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante se modifica por ingeniería genética para que tenga una mayor estabilidad (con estabilidad madurada). En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante tiene una mayor actividad de ADCC en comparación con PR1A3. En un modo de realización, la mayor ADCC de la molécula de unión a antígeno variante se debe a un aumento de la afinidad de la molécula de unión a antígeno variante para el CEA unido a membrana, por ejemplo, por maduración de la afinidad u otros procedimientos para mejorar la afinidad (véase Tang et al. J. Immunol. 2007, 179:2815-2823). En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante comprende una región Fc que está modificada por glicoingeniería. En otro aspecto, la divulgación también se refiere a procedimientos para fabricar dichas moléculas de unión a antígeno variantes y su uso en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de proliferación celular en los que se expresa el CEA, particularmente, en los que el CEA se expresa de forma anómala (por ejemplo, está sobreexpresado o expresado en un patrón diferente en la célula) en comparación con el tejido normal del mismo tipo de célula. Dichos trastornos incluyen, sin limitación, cáncer colorrectal, CPNM (cáncer de pulmón no microcítico), cáncer gástrico, cáncer de páncreas y cáncer de mama. Los niveles de expresión de CEA pueden determinarse mediante procedimientos conocidos en la técnica y mediante los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, mediante ensayo inmunohistoquímico, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, inmunoelectrotransferencia, unión a ligandos, actividad cinasa, etc.).

En otro aspecto, la divulgación también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo PR1A3 murino, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen al menos los residuos determinantes de la especificidad para dichas regiones determinantes de la complementariedad. Típicamente, dichos polinucleótidos aislados codifican uno o más polipéptidos de fusión que forman una molécula de unión a antígeno. En un modo de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDR seleccionadas de las SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 y 217-224, que comprenden los residuos de las CDR que conservarán la unión específica. En un modo de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica al menos tres CDR de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y/o tres CDR de cadena ligera (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 y 217-224, o variantes o formas truncadas de los mismos que contienen al menos los residuos determinantes de la especificidad (SDR) para cada una de dichas tres regiones determinantes de la complementariedad. En un modo de realización más específico, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 217-224 y dos CDR de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10 y 12-24 y tres CDR de cadena ligera (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de SEQ ID NO: 36-56. En otro modo de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la región o regiones variables de una cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden expresar en uno o más vectores de expresión. En un modo de realización más particular, el polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 y SEQ ID NO: 225-248 se selecciona del grupo de polinucleótidos de SEQ ID NO: 159-187 y SEQ ID NO: 249-256 o una combinación de los mismos, en los que las regiones variables de cadena pesada y ligera no son codificadas por una combinación de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 116. En un modo de realización, los polipéptidos de la región variable de cadena pesada y ligera codificados por los polinucleótidos se combinan para formar un anticuerpo quimérico, más específicamente, un anticuerpo humanizado. En un modo de realización específico, cuando el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la CDR1 de cadena pesada de PR1A3 o una variante de la misma, dicho polinucleótido codifica una valina sustituida por un glutamato en la posición 31 de Kabat. En un modo de realización específico, cuando el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la CDR3 de cadena pesada de PR1A3 o una variante de la misma, dicho polinucleótido codifica una tirosina sustituida por una alanina en la posición 98 de Kabat o un aspartato sustituido por una tirosina en la posición 99 de Kabat. En un modo de realización específico, cuando el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la CDR3 de cadena pesada de PR1A3 o una variante de la misma, dicho polinucleótido codifica una tirosina sustituida por una alanina en la posición 98 de Kabat y un aspartato sustituido por una tirosina en la posición 99 de Kabat. En un modo de realización, el polinucleótido codifica una tirosina sustituida por una alanina en la posición 98 de Kabat o un aspartato sustituido por una tirosina en la posición 99 de Kabat en la estructura de CH1A1A (SEQ ID NO: 261) o CH1A1B (SEQ ID NO: 262). En un modo de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la cadena pesada de SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 o SEQ ID NO: 247. En otro modo de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una región Fc. La divulgación se refiere además a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

En un aspecto, la presente divulgación está relacionada con moléculas de unión a antígeno o moléculas de unión a antígeno variantes (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) y polipéptidos que tienen la misma especificidad de unión del anticuerpo PR1A3 murino (por ejemplo, unión al mismo epítipo del CEA unido a membrana) y que tienen actividades biológicas similares o mejoradas (por ejemplo, afinidad mejorada por el CEA unido a membrana, mayor estabilidad y/o ADCC potenciada). En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante se une al mismo epítipo que el de la molécula de unión a antígeno original. En un modo de realización, la

molécula de unión a antígeno variante compite por la unión al CEA humano unido a membrana con la molécula de unión a antígeno original. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante se une al CEA humano unido a membrana y no se une al CEA humano soluble. En un aspecto, la presente divulgación está relacionada con moléculas de unión a antígeno y moléculas de unión a antígeno variantes y polipéptidos que tienen una mayor estabilidad en comparación con el anticuerpo PR1A3 murino, o una variante humanizada del mismo. En un aspecto, la presente divulgación está relacionada con moléculas de unión a antígeno y moléculas de unión a antígeno variantes (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) y polipéptidos que se unen al CEA unido a membrana y tienen una mayor estabilidad en comparación con un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende la región variable de cadena pesada de CH7A (SEQ ID NO: 101). En un aspecto, la presente divulgación está relacionada con moléculas de unión a antígeno y moléculas de unión a antígeno variantes (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) y polipéptidos que se unen al CEA unido a membrana y tienen mayor estabilidad en comparación con un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende la región variable de cadena pesada CH7A (SEQ ID NO: 101) y la región variable de cadena ligera 2F1 (SEQ ID NO: 209).

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante o el polipéptido comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDR seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 y 217-224 (figura 32 y figura 36). En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante o el polipéptido comprende: (a) una secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12; (b) una secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24; y (c) una secuencia de CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 y SEQ ID NO: 224. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante o el polipéptido comprende: (a) una secuencia de CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45; (b) una secuencia de CDR de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55; y (c) una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 56. En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno variante o el polipéptido que comprende las CDR también comprende los residuos estructurales de CH1A1A (SEQ ID NO: 261) o CH1A1B (SEQ ID NO: 262).

En un aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno variante o un polipéptido que se une al CEA humano unido a membrana que comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera. En un modo de realización, la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera se selecciona de la región variable de cadena pesada y/o ligera seleccionada de SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 y SEQ ID NO: 225-248 (figura 33 y figura 37A-C). En un modo de realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que tiene la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO: 225-248. En otro modo de realización específico, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que tiene una secuencia que es idéntica en al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO: 225-248.

En un modo de realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 233; SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 y SEQ ID NO: 247. En otro modo de realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 y SEQ ID NO: 247. En un modo de realización, la región variable de cadena ligera comprende un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 209. En otro modo de realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 209. .

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno, la molécula de unión a antígeno variante o el polipéptido que se une al CEA humano unido a membrana comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En un modo de realización específico, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4 de la siguiente manera:

QVQLVQSGSELKKGASVVKVSKASGYTFTEX¹X²MX³WVRQAPGQ
GLEWMGX⁴INTKX⁵GEAX⁶YX⁷EEFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLK
AEDTAVYYCARWDX⁸X⁹YX¹⁰X¹¹X¹²X¹³X¹⁴DYWGQGTTVTVSS

en la que X¹ es Y o F; X² es S o G; X³ es N o S; X⁴ es W o Y; X⁵ es N, T o S; X⁶ es T o N; X⁷ es V o I; X⁸ es F o A; X⁹ es Y, A, V, F o S; X¹⁰ es D, H, W, E o Y; X¹¹ es V, L o F; X¹² es E, K o Q; X¹³ es A o T; y X¹⁴ es M o L.

En un modo de realización específico, la región variable de cadena ligera comprende un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11 de la siguiente manera:

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASX¹⁵X¹⁶X¹⁷X¹⁸X¹⁹X²⁰VAWYQQKPGKAPKX²¹LIYX²²
ASX²³X²⁴X²⁵X²⁶GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGGQGTKLEIK

10 en la que X¹⁵ es Q, A, K o H; X¹⁶ es N, A, Y, I, K, T o F; X¹⁷ es V, A, G o M; X¹⁸ es G, S, T o L; X¹⁹ es T, N, P o A; X²⁰ es N o Y; X²¹ es P o L; X²² es S, L o W; X²³ es Y, N o H; X²⁴ es R, L, P o H; X²⁵ es Y, S, Q, K, E, F o P; y X²⁶ es S, G, I o R.

15 En otro aspecto, la divulgación se refiere además a polinucleótidos aislados que codifican las moléculas de unión a antígeno, moléculas de unión de antígeno variantes, o polipéptidos que se unen al CEA unido a membrana. En un modo de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica al menos tres CDR de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y/o tres CDR de cadena ligera (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 y 217-224, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen al menos los residuos determinantes de la especificidad (SDR) para cada una de dichas tres regiones determinantes de la complementariedad. En un modo de realización más específico, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 217-224 y dos CDR de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de SEQ ID NO: 1-3, 5-10 y 12-24 y tres CDR de cadena ligera (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de SEQ ID NO: 36-56. En otro modo de realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la región o regiones variables de una cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden expresar en uno o más vectores de expresión. En un modo de realización más particular, el polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 y SEQ ID NO: 225-248 se selecciona del grupo de polinucleótidos seleccionados de SEQ ID NO: 159-187 y SEQ ID NO: 249-256 o una combinación de los mismos, en los que las regiones variables de cadena pesada y ligera no son codificadas por una combinación de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 116. En un modo de realización, los polipéptidos de la región variable de cadena pesada y ligera codificados por los polinucleótidos se combinan para formar un anticuerpo quimérico, más específicamente, un anticuerpo humanizado.

35 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno, la molécula de unión de antígeno variante o el polipéptido se une al CEA unido a membrana comprende una región Fc. En un modo de realización más específico, la molécula de unión a antígeno, la molécula de unión a antígeno variante o el polipéptido se modifica por glicoingeniería para tener un patrón alterado de glicosilación en la región Fc. En un modo de realización particular, la afinidad por el CEA unido a membrana de la molécula de unión a antígeno variante o del polipéptido aumenta en comparación con el anticuerpo PR1A3 original. En otro modo de realización, la estabilidad de la molécula de unión a antígeno variante o del polipéptido aumenta en comparación con el anticuerpo PR1A3 original. En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante o el polipéptido tiene mayor actividad de ADCC. En un modo de realización, la mayor ADCC de la molécula de unión a antígeno variante o del polipéptido se debe a un aumento de la afinidad del polipéptido por el CEA unido a membrana, por ejemplo, mediante maduración de la afinidad u otros procedimientos para mejorar la afinidad.

45 En otro aspecto, la divulgación también se refiere al uso de la molécula de unión a antígeno, molécula de unión a antígeno variante o polipéptido en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de proliferación celular en los que se expresa el CEA, particularmente en los que el CEA se expresa de forma anómala (por ejemplo, está sobreexpresado o expresado en un patrón diferente en la célula) en comparación con el tejido normal del mismo tipo de célula. Dichos trastornos incluyen, sin limitación, cáncer colorrectal, CPNM (cáncer de pulmón no microcítico), cáncer gástrico, cáncer de páncreas y cáncer de mama. Los niveles de expresión de CEA pueden determinarse mediante procedimientos conocidos en la técnica y mediante los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, mediante ensayo inmunohistoquímico, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, inmunoelctrotransferencia, unión a ligandos, actividad cinasa, etc.).

55 En un modo de realización particular, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno humanizada o a una parte o fragmento de la misma que se une al CEA unido a membrana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO: 225-248. En otro modo de realización, la divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno humanizada o a una parte o fragmento de la misma que se une al CEA unido a membrana que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO: 105, 108 o 207-216. En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno humanizada o a una parte o fragmento de la misma que se une al CEA unido a membrana comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO: 225-248 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO: 105, 108 o 207-216. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno humanizada comprende además una región constante de cadena pesada humana y/o una región constante de cadena ligera humana. Dichas regiones constantes se describen

en el presente documento y son conocidas en la técnica. En un modo de realización más particular, la molécula de unión a antígeno humanizada comprende una región Fc, más particularmente, una región Fc que se ha modificado por glicoingeniería.

5 Se conocen en la técnica procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, las ABM humanizadas descritas en el presente documento pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos de la patente de EE. UU. n.º 5.225.539 de Winter, la patente de EE. UU. n.º 6.180.370 de Queen et al. o la patente de EE. UU. n.º 6.632.927 de Adair et al. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de «importación», que típicamente se toman de un dominio variable de «importación». La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986), Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Típicamente, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se han sustituido por residuos de sitios análogos en anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor). Los anticuerpos anti-CEA humanizados de sujetos comprenderán opcionalmente regiones constantes de una inmunoglobulina humana.

20 La elección de dominios variables humanos de cadena ligera y pesada para fabricar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado procedimiento de «mejor ajuste», la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un donante (por ejemplo, roedor) se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que más se asemeja a la del donante (por ejemplo, roedor) se acepta entonces como la región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro procedimiento para seleccionar la secuencia estructural humana es comparar la secuencia de cada subregión individual de la estructura completa (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) del donante (por ejemplo, roedor) o alguna combinación de las subregiones individuales (por ejemplo, FR1 y FR2) con una biblioteca de secuencias de regiones variables humanas conocidas que corresponden a esa subregión estructural (por ejemplo, como se determina por la numeración de Kabat), y elegir la secuencia humana para cada subregión o combinación que más se asemeje a la del roedor (Leung, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. n.º 2003/0040606A1, publicada el 27 de febrero de 2003). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)). En un modo de realización, las regiones estructurales humanas se seleccionan de una colección de secuencias de línea germinal humana. Dichas colecciones de secuencias de la línea germinal humana se pueden encontrar en bases de datos tales como IMGT o VBase. Las regiones estructurales pueden seleccionarse individualmente (por ejemplo, las FR1-3 seleccionadas para el aceptor para las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de las ABM anti-CEA humanizadas pueden codificarse por diferentes genes de línea germinal) o como parte del mismo gen de línea germinal. En un modo de realización más específico, las FR1-3 de cadena pesada son codificadas por la secuencia del gen de la línea germinal de la inmunoglobulina humana IGHV7_4_1*02 (n.º de registro X62110, SEQ ID NO: 114). En otro modo de realización específico, las FR1-3 de cadena ligera son codificadas por la secuencia del gen de la línea germinal de la inmunoglobulina humana IMGT_hVK_1_39 (n.º de registro X59315, SEQ ID NO: 118). En otro modo de realización específico, la FR4 de cadena pesada es codificada por la secuencia del gen de la línea germinal JH6 (véase n.º de registro en GenBank M63030). En otro modo de realización específico, la FR4 de cadena ligera es codificada por la secuencia del gen de la línea germinal JK2 (véase n.º de registro en GenBank X61584).

50 En general, es deseable que las moléculas de unión a antígeno, tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos, se humanicen con conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. En consecuencia, en un modo de realización, los anticuerpos humanizados se preparan analizando las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El análisis de estas presentaciones ayuda a determinar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de receptor y de importación, de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están implicados directamente y de forma más sustancial en influir en la unión al antígeno.

65 En un aspecto, la divulgación se refiere a moléculas de unión a antígeno anti-CEA humanizadas con afinidad madurada y/o variantes con propiedades y características deseables que incluyen, sin limitación: fuerte afinidad de unión por el antígeno CEA, en particular, el CEA unido a membrana, sin tener sustancialmente ninguna reactividad cruzada contra

el CEA soluble; una capacidad para inducir la lisis celular de células que expresan el CEA *in vitro* y *ex vivo*, preferentemente de una manera dependiente de la dosis; una capacidad para inhibir la adhesión celular mediada por CEA *in vitro*; una capacidad para inhibir el crecimiento de tejido tumoral y/o para inducir la regresión del tejido tumoral (por ejemplo, como se demuestra en modelos tumorales (por ejemplo, xenoinjerto de ratón)).

5 Como se describe en el presente documento, en algunos modos de realización, las moléculas de unión a antígeno variantes descritas en el presente documento tienen una afinidad de unión incrementada, por ejemplo, debido a la maduración de la afinidad de un anticuerpo original que comprende una o más CDR del anticuerpo PR1A3. La afinidad de las moléculas de unión a antígeno y las moléculas de unión de antígeno variante descritas en el presente documento se puede determinar por procedimientos conocidos en la técnica y como se describe en el presente documento. En un modo de realización específico, las moléculas de unión a antígeno humanizadas o variantes descritas en el presente documento se unen al CEA humano, preferentemente CEA unido a membrana, con un valor de constante de afinidad monovalente (K_D) de no más de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 0,001 nM, más específicamente no más de aproximadamente 800 nM a aproximadamente 1 nM, e incluso más específicamente no más de aproximadamente 550 nM a aproximadamente 10 nM. En un modo de realización específico, la molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo con afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de constante de afinidad monovalente (K_D) de no más de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 nM. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo con afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de constante de afinidad monovalente (K_D) de no más de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 0,01 nM. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo con afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de constante de afinidad monovalente (K_D) de no más de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 0,1 nM. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo con afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de constante de afinidad monovalente (K_D) de 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM o menor. En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo con estabilidad madurada (modificado para tener mayor estabilidad) o fragmento del mismo que conserva la afinidad de unión aumentada de su molécula original con afinidad madurada. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante se une al CEA unido a la membrana con una afinidad mayor que con la que se une al CEA circulante. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante se une al CEA unido a membrana con una afinidad 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces mayor o más alta que con la que se une al CEA circulante.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno variante descrita en el presente documento típicamente se une al mismo epítipo que reconoce el anticuerpo de ratón PR1A3, o es capaz de competir con el anticuerpo PR1A por la unión al CEA unido a membrana. Para detectar anticuerpos que se unen al epítipo en CEA humano unido por un anticuerpo de interés (por ejemplo, aquellos que bloquean la unión del anticuerpo PR1A3 al CEA humano), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane eds. (1988). De forma alternativa, se puede realizar el mapeo de epítopos, por ejemplo, como se describe en Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995), para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

En un modo de realización, las moléculas de unión a antígeno variantes específicas para el CEA humano se preparan a partir de una molécula de unión a antígeno anti-CEA original que comprende al menos una CDR del anticuerpo monoclonal PR1A3, en la que el anticuerpo anti-CEA original se une al mismo epítipo que el anticuerpo PR1A3 y es capaz de competir con PR1A3 por la unión al antígeno. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno original comprende al menos una, dos o típicamente tres CDR de cadena pesada del anticuerpo PR1A3; en otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno original comprende al menos una, dos o típicamente tres CDR de cadena ligera del anticuerpo PR1A3; en otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno original comprende las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera del anticuerpo PR1A3. Preferentemente, cuando la molécula de unión a antígeno variante comprende la HCDR1 de PR1A3, dicha HCDR1 comprende una sustitución de valina por glutamato en la posición 31 de Kabat. Las ABM variantes típicamente tienen una mayor afinidad por CEA que las moléculas originales. En un modo de realización, las ABM variantes tienen mayor estabilidad en comparación con la molécula original. En un modo de realización, la ABM variante comprende una región Fc. En un modo de realización, la ABM variante se modifica por glicoingeniería. En un modo de realización, la ABM variante tiene una mayor actividad de ADCC en comparación con la ABM original. En un modo de realización particular, la mayor ADCC es el resultado del aumento de la afinidad, conseguido, por ejemplo, mediante la maduración de la afinidad de la ABM original para generar la ABM variante. En un modo de realización más particular, el aumento de ADCC es de al menos aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 100 % en comparación con dicha molécula de unión a antígeno original. En otro modo de realización particular, la ABM variante aumenta la ADCC en al menos de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 % en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. En un modo de realización más particular, la ABM variante es al menos de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 1000 veces más potente para inducir ADCC a una concentración dada en comparación con el anticuerpo PR1A3 murino. En otro modo de realización particular, la mayor actividad de ADCC es un resultado de la modificación por glicoingeniería de la región Fc. En otro modo de realización particular, la mayor actividad de ADCC es un resultado de una combinación de afinidad aumentada y modificación por glicoingeniería.

En un modo de realización, las moléculas de unión a antígeno variantes descritas en el presente documento comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en al menos una CDR. El número de sustituciones de aminoácidos puede variar de una a diez (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), preferentemente de dos a cinco (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5). En un modo de realización, al menos una CDR de cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos. En otro modo de realización, al menos una CDR de cadena ligera comprende una o más sustituciones de aminoácidos. En otro modo de realización, al menos una CDR de cadena pesada comprende una o más sustituciones, y al menos una CDR de cadena ligera comprende una o más sustituciones. Preferentemente, cuando la molécula de unión a antígeno variante comprende la HCDR1 de PR1A3, dicha HCDR1 comprende una sustitución de valina por glutamato en la posición 31 de Kabat.

Se realizan modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de las moléculas de unión a antígeno seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en forma de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Las moléculas de unión a antígeno variantes que comprenden sustituciones de aminoácidos pueden tener actividades biológicas mejoradas, por ejemplo, afinidad de unión a antígeno mejorada y ADCC potenciada, en comparación con la molécula de unión a antígeno original. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir mediante diversas técnicas conocidas en la técnica que incluyen, sin limitación, mutagénesis dirigida al sitio y/o maduración de afinidad de la molécula de unión a antígeno original, por ejemplo, mediante presentación en fagos.

Para identificar sitios candidatos, por ejemplo, residuos de la región hipervariable, para su modificación, se puede realizar una mutagénesis por barrido de alanina para encontrar los residuos que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa, o adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno y anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el CEA humano. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se puede someter a cribado mediante procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo adicional.

La presentación en fagos se puede usar para generar un repertorio de secuencias de regiones hipervariables a partir de una molécula de unión a antígeno original que contiene una o más mutaciones de aminoácidos aleatorias. Por ejemplo, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones aminoacídicas en cada sitio. De forma alternativa, la mutagénesis aleatoria puede realizarse en regiones variables de cadena pesada y/o ligera. Las mutaciones pueden generarse por técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, sin limitación, el uso de cebadores de mutagénesis, el control del número de ciclos y el uso de los análogos nucleotídicos mutagénicos 8-oxo-dGTP y dPTP durante la amplificación por PCR. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se criban a continuación por sus actividades biológicas (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento y las candidatas que tienen una o más actividades mejoradas se usarán para un desarrollo posterior. Los procedimientos para elaborar bibliotecas de presentación en fagos se pueden encontrar en Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA*, 88:4363-4366 (1991). Un procedimiento alternativo para identificar moléculas de unión a antígeno con afinidad madurada se puede encontrar, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.432.063 de Balint et al.

En algunos modos de realización, las moléculas de unión a antígeno y las moléculas de unión a antígeno variantes descritas en el presente documento comprenden una región Fc, preferentemente una región Fc humana. Las secuencias y estructuras de las regiones Fc son conocidas en la técnica y se han caracterizado. En un modo de realización específico, la región constante humana es IgG1, como se establece en SEQ ID NO: 121 y 122.

Sin embargo, las variantes e isoformas de la región Fc humana también están abarcadas por la presente divulgación. Por ejemplo, las regiones Fc variantes adecuadas para su uso en la presente divulgación pueden producirse de acuerdo con los procedimientos enseñados en la patente de los EE. UU. n.º 6.737.056 de Presta (variantes de la región Fc con alteración de la función efectora debido a una o más modificaciones de aminoácidos); o en las solicitudes de patente de EE. UU. n.º 60/439.498; 60/456.041; 60/514.549; o el documento WO 2004/063351 (regiones Fc variantes con afinidad de unión aumentada debido a la modificación de aminoácidos); o en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 10/672.280 o el documento WO 2004/099249 (variantes de Fc con unión alterada a FcγR debido a la modificación de aminoácidos). En un modo de realización particular, las ABM anti-CEA y las ABM variantes comprenden una región Fc que se ha modificado por glicoingeniería para alterar la actividad de función efectora de la ABM (por ejemplo, disminuir la fucosilación, mejorar la afinidad de unión al receptor Fc, aumentar la ADCC, etc.). Los procedimientos de modificación por glicoingeniería que se pueden usar se describen en detalle a continuación en el presente documento y son conocidos en la técnica.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno o una molécula de unión a antígeno variante descrita en el presente documento se conjugan con un resto adicional, tal como un radiomarcador o una toxina. Dichas moléculas

de unión a antígeno conjugadas pueden producirse mediante numerosos procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Los conjugados con ABM anti-CEA se describen en detalle a continuación en el presente documento en la sección titulada «Conjugados con moléculas de unión a antígeno anti-CEA».

5 Vectores de expresión y células hospedadoras

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un vector de expresión y/o una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos aislados como se describen en el presente documento. Por ejemplo, la célula hospedadora o vector de expresión comprende uno cualquiera o más de los polinucleótidos o polinucleótidos que codifican los polipéptidos, ABM y/o ABM variantes descritos en el presente documento. En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para producir una ABM que se une al CEA humano unido a membrana, comprendiendo el procedimiento: cultivo de una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos aislados como se describen en el presente documento o un vector de expresión que comprende uno o más polinucleótidos aislados como se describen en el presente documento en un medio en condiciones que permiten la expresión de dicho uno o más polinucleótidos, en el que dicho uno o más polinucleótidos codifican uno o más polipéptidos que forman parte de la ABM; y recuperación de dicha ABM, en la que dicha ABM o una parte de la misma se une al CEA unido a membrana.

En general, cualquier tipo de línea celular cultivada se puede usar para expresar la ABM descrita en el presente documento. En un modo de realización preferente, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales se usan como la línea celular de base para generar las células hospedadoras modificadas genéticamente descritas en el presente documento.

En un modo de realización específico, la célula hospedadora o el vector de expresión comprende uno o más polinucleótidos que codifican una ABM anti-CEA como se proporciona en el presente documento. En un modo de realización, el anticuerpo tiene afinidad madurada. El anticuerpo con afinidad madurada generalmente tiene una afinidad de unión mejorada con respecto a la del anticuerpo de referencia a partir del cual se deriva el anticuerpo con afinidad madurada. En otro modo de realización, el anticuerpo tiene propiedades terapéuticas deseables, incluyendo, sin limitación: fuerte afinidad de unión por el antígeno CEA, en particular, el CEA unido a membrana, al tiempo que no tiene sustancialmente ninguna reactividad cruzada contra el CEA soluble; una capacidad para inducir la lisis celular de células con expresión de CEA *in vitro* y *ex vivo*, preferentemente de una manera dependiente de la dosis; una capacidad para inhibir la adhesión celular mediada por CEA *in vitro*; una capacidad para inhibir el crecimiento de tejido tumoral y/o para inducir la regresión de tejido tumoral en modelos tumorales en ratones (por ejemplo, xenoinjerto de ratón). En otro modo de realización, el anticuerpo tiene mayor estabilidad en comparación con el anticuerpo original del que se deriva el anticuerpo más estable. En otro modo de realización, el anticuerpo variante o fragmento del mismo comprende un Fc humano.

En un modo de realización, uno o varios polinucleótidos que codifican una ABM como se describe en el presente documento pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, de forma alternativa, un sistema de expresión regulado. Los sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, sin limitación, un sistema de expresión regulado por tetraciclinas, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión *lac-switch*, un sistema de expresión inducible por glicocorticoides, un sistema promotor inducible por temperatura y un sistema de expresión inducible por metal de metalotioneína. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican una ABM como se describe en el presente documento están comprendidos dentro del sistema de la célula hospedadora, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Se considera que el nivel máximo de expresión es el nivel más alto posible de expresión de polipéptido estable que no tiene un efecto adverso significativo sobre la velocidad de crecimiento celular, y se determinará usando experimentación rutinaria. Los niveles de expresión se determinan mediante procedimientos generalmente conocidos en la técnica, incluyendo el análisis mediante inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo específico para la ABM o un anticuerpo específico para una etiqueta peptídica fusionada con la ABM; y análisis de transferencia Northern. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede unirse operativamente a un gen indicador; los niveles de expresión de una ABM divulgada en el presente documento se determinan midiendo una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen indicador. El gen indicador se puede transcribir junto con el o los ácidos nucleicos que codifican dicha ABM como una única molécula de ARNm; sus secuencias de codificación respectivas pueden unirse por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o por un potenciador de la traducción independiente de la caperuza (CITE). El gen indicador puede traducirse junto con al menos un ácido nucleico que codifica una ABM divulgada en el presente documento de modo que se forme una cadena polipeptídica única. Los ácidos nucleicos que codifican una ABM como se describe en el presente documento se pueden unir operativamente al gen indicador bajo el control de un único promotor, de modo que el ácido nucleico que codifica la ABM y el gen indicador se transcriben en una molécula de ARN que se empalma de forma alternativa a dos moléculas de ARN mensajero (ARNm) separadas; uno de los ARNm resultantes se traduce en dicha proteína indicadora y la otro se traduce en la ABM.

Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una ABM anti-CEA proporcionada en el presente documento junto con señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN

recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989).

5 Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión de hospedadores para expresar la secuencia codificante de las ABM descritas en el presente documento. Preferentemente, las células de mamífero se usan como sistemas de células hospedadoras transfectadas con vectores de expresión de ADN de plásmido recombinante o de ADN de cósmido que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante del polipéptido de fusión. Más preferentemente, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma P3X63 de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales se utilizan como sistema de células hospedadoras. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y procedimientos de selección se describen en las siguientes referencias y referencias citadas en ellas: Borth et al., Biotechnol. Bioen. 71(4):266-73 (2000-2001), en Werner et al., Arzneimittelforschung/Drug Res. 48(8):870-80 (1998), en Andersen y Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123 (2002), en Chadd y Chamow, Curr. Op. Biotechnol. 12:188-194 (2001), y en Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12. 450-454 (2001).

20 En modos de realización alternativos, pueden usarse otros sistemas de células hospedadoras eucariotas, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la secuencia codificante de una ABM como se describe en el presente documento, tales como los sistemas de expresión enseñados en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 60/344.169 y el documento WO 03/056914 (procedimientos para producir glicoproteína de tipo humano en una célula hospedadora eucariota no humana); sistemas de células de insecto infectados por vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen la secuencia codificante de un anti-CEA; sistemas de células vegetales infectados por vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia codificante de la ABM descrita en el presente documento, incluyendo, sin limitación, los sistemas de expresión enseñados en la patente de EE. UU. n.º 6.815.184 (procedimientos para la expresión y secreción de polipéptidos biológicamente activos a partir de lenteja de agua modificada genéticamente); el documento WO 2004/057002 (producción de proteínas glicosiladas en células vegetales de briofitas mediante la introducción de un gen de la glicosiltransferasa) y el documento WO 2004/024927 (procedimientos para generar proteínas heterólogas extracelulares no vegetales en protoplasto de musgo); y las solicitudes de patente de EE. UU. n.º 60/365.769, 60/368.047 y el documento WO 2003/078614 (procesamiento de glicoproteínas en plantas transgénicas que comprenden una enzima GnTIII de mamífero funcional); o sistemas de células animales infectados por vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, adenovirus, virus de la vaccinia) que incluyen líneas celulares modificadas por ingeniería genética para contener múltiples copias del ADN que codifica una ABM anti-CEA quimérica amplificada de forma estable (CHO/dhfr) o amplificada de forma inestable en cromosomas diminutos dobles (por ejemplo, líneas celulares murinas). En un modo de realización, el vector que comprende el polinucleótido o polinucleótidos que codifican la ABM descrita en el presente documento es policistrónico. Además, en un modo de realización, la ABM analizada anteriormente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En un modo de realización, la ABM es un anticuerpo con afinidad madurada. En un modo de realización, la ABM es un anticuerpo con estabilidad madurada.

45 En general, es preferente la expresión estable a la expresión transitoria porque normalmente logra resultados más reproducibles y también es más susceptible a la producción a gran escala; sin embargo, está dentro de la experiencia de cualquier experto en la técnica determinar si la expresión transitoria es mejor para una situación particular. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con los respectivos ácidos nucleicos codificantes controlados por elementos del control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción de ADN extraño, se puede permitir que las células modificadas por ingeniería genética crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite la selección de células que han integrado de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

55 Se pueden usar varios sistemas de selección, incluyendo, sin limitación, los genes de la timidina-cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026 (1962)) y la adenina-fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)), que se pueden emplear en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Además, la resistencia a los antimetabolitos se puede utilizar como base de selección para los genes dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:3567 (1989); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Recientemente se han descrito genes seleccionables adicionales, a saber, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988)); el sistema de

glutamina-sintasa; y ODC (ornitina-descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina-descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

5 La presente divulgación se refiere además a un procedimiento para modificar el perfil de glicosilación de las ABM descritas en el presente documento que son producidas por una célula hospedadora, que comprende expresar en dicha célula hospedadora un ácido nucleico que codifica una ABM como se describe en el presente documento y un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad glicosiltransferasa, o un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. Los genes con actividad glicosiltransferasa incluyen $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), α -manosidasa II (ManII), $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (GalT), $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII). En un modo de realización, una combinación de genes con actividad glicosiltransferasa se expresa en la célula hospedadora (por ejemplo, GnTIII y ManII). Del mismo modo, el procedimiento también abarca la expresión de uno o más polinucleótidos que codifican la ABM en una célula hospedadora en la que un gen de glicosiltransferasa se ha interrumpido o, de algún otro modo, desactivado (por ejemplo, una célula hospedadora en la que la actividad del gen que codifica α 1-6 fucosiltransferasa del núcleo se ha desactivado). En otro modo de realización, las ABM descritas en el presente documento se pueden producir en una célula hospedadora que expresa además un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII para modificar el patrón de glicosilación. En un modo de realización específico, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización de Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En otro modo de realización preferente, la expresión de las ABM descritas en el presente documento en una célula hospedadora que expresa un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de GnTIII da como resultado ABM con una mayor afinidad de unión al receptor Fc y una mayor función efectora. En consecuencia, en un modo de realización, la presente divulgación se refiere a una célula hospedadora que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII; y (b) un polinucleótido aislado que codifica una ABM como se describe en el presente documento, tal como un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado que se une al CEA humano. En un modo de realización preferente, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización de Golgi es el dominio de localización de manosidasa II. Los procedimientos para generar dichos polipéptidos de fusión y para usarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras aumentadas se divulgan en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 60/495.142 y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0241817. En un modo de realización particular, la ABM modificada producida por la célula hospedadora tiene una región constante de IgG o un fragmento de la misma que comprende la región Fc. En otro modo de realización particular, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende una región Fc.

35 Las ABM con glicosilación alterada producidas por las células hospedadoras descritas en el presente documento presentan típicamente mayor afinidad de unión al receptor de Fc y/o mayor función efectora como resultado de la modificación de la célula hospedadora (por ejemplo, por expresión de un gen de glicosiltransferasa). Preferentemente, la mayor afinidad de unión al receptor Fc es una mayor unión a un receptor activador de Fc γ , tal como el receptor Fc γ RIIIa. La mayor función efectora es preferentemente un incremento en uno o más de los siguientes: aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, aumento de la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), aumento de la secreción de citocinas, aumento de la captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos, aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a células polimorfonucleares (PMN), aumento de la unión a monocitos, aumento de la reticulación de anticuerpos unidos a su diana, aumento de la transducción directa de señales que induce la apoptosis, aumento de la maduración de células dendríticas y aumento de la activación de linfocitos T.

Generación y uso de ABM que tienen una función efectora incrementada, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

50 En un aspecto, la presente divulgación proporciona glicofomas de ABM anti-CEA (por ejemplo, ABM variantes) que tienen una función efectora incrementada, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La ingeniería de glicosilación de anticuerpos se ha descrito previamente. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.602.684. Los procedimientos para producir ABM a partir de células hospedadoras que tienen una actividad alterada de genes que intervienen en la glicosilación se describen también en el presente documento en detalle (véase, por ejemplo, la sección anterior titulada «Vectores de expresión y células hospedadoras»). Los aumentos en la ADCC de las ABM descritas en el presente documento también se logran aumentando la afinidad de la molécula de unión a antígeno para el CEA unido a membrana, por ejemplo, por maduración de la afinidad u otros procedimientos para mejorar la afinidad (véase Tang et al., J. Immunol. 2007, 179:2815-2823). Las combinaciones de estos enfoques también están abarcadas por la presente divulgación.

65 Los ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales no conjugados (mAb) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer recientemente han dado resultados alentadores (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997); Deo et al., Immunology Today 18:127 (1997)). Una IgG1 no conjugado quimérica se ha aprobado para el linfoma de Hodgkin de linfocitos B de bajo grado o folicular (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997)), mientras que otro mAb no conjugado, una IgG1 humanizada que se dirige a tumores de mama sólidos, también ha mostrado

resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III (Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997)). Los antígenos de estos dos mAb se expresan altamente en sus respectivas células tumorales y los anticuerpos median una potente destrucción del tumor por células efectoras *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario, muchos otros mAb no conjugados con pequeñas especificidades tumorales no pueden desencadenar funciones efectoras con una potencia suficiente como para ser clínicamente útiles (Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996)). Para algunos de estos mAb más débiles, actualmente se está probando el tratamiento complementario con citocinas. La adición de citocinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) al aumentar la actividad y el número de linfocitos circulantes (Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996)). La ADCC, un ataque lítico sobre las células diana, se desencadena cuando los receptores de leucocitos se unen a la región constante (Fc) de los anticuerpos (Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997)).

Una estrategia diferente, pero complementaria, para aumentar la actividad de ADCC de las IgG1 no conjugadas es modificar genéticamente la región Fc del anticuerpo. Los estudios de ingeniería de proteínas han demostrado que los FcγR interactúan con la región de bisagra inferior del dominio CH2 de la IgG (Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)). Sin embargo, la unión a FcγR también requiere la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente al Asn 297 conservado en la región CH2 (Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright y Morrison, *Trends Biotech.* 15: 26-31 (1997)), lo que sugiere que tanto el oligosacárido como el polipéptido contribuyen directamente al sitio de interacción o que el oligosacárido es necesario para mantener una conformación polipeptídica activa en CH2. Por lo tanto, la modificación de la estructura de los oligosacáridos puede explorarse como un medio para aumentar la afinidad de la interacción.

Una molécula de IgG porta dos oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Como cualquier glicoproteína, un anticuerpo se produce como una población de glicofomas que comparten el mismo esqueleto polipeptídico pero tienen oligosacáridos diferentes unidos a los sitios de glicosilación. Los oligosacáridos normalmente encontrados en la región Fc de la IgG sérica son de tipo complejo biantenarico (Wormald et al., *Biochemistry* 36:130-38 (1997)), con un bajo nivel de ácido siálico terminal y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación del núcleo. Algunos estudios sugieren que la estructura mínima de carbohidratos requerida para la unión a FcγR se encuentra dentro del núcleo de los oligosacáridos (Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)).

Las líneas celulares derivadas de ratón o hámster utilizadas en la industria y el mundo académico para la producción de mAb terapéuticos no conjugados normalmente unen los determinantes oligosacarídicos requeridos a los sitios Fc. Sin embargo, las IgG expresadas en estas líneas celulares carecen de la GlcNAc bisectante encontrada en bajas cantidades en las IgG séricas (Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995)). Por el contrario, recientemente se observó que una IgG1 humanizada producida por mieloma de rata (CAMPATH-1H) portaba una GlcNAc bisectante en algunas de sus glicofomas (Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995)). El anticuerpo derivado de células de rata alcanzó una actividad de ADCC *in vitro* máxima similar a la de los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares estándar, pero a concentraciones de anticuerpo significativamente menores.

El antígeno CAMPATH normalmente está presente en niveles elevados en células de linfoma y este mAb quimérico tiene una alta actividad de ADCC en ausencia de una GlcNAc bisectante (Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995)). En la ruta de glicosilación con uniones por enlaces *N*-glicosídicos, GnTIII añade una GlcNAc bisectante (Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986)).

Estudios previos utilizaron una única línea de células CHO productoras de anticuerpos que se modificó previamente por ingeniería genética para expresar, de forma regulada externamente, diferentes niveles de un gen de la enzima GnTIII clonado (Umaña, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Esta estrategia estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de una glicosiltransferasa (por ejemplo, GnTIII) y la actividad de ADCC del anticuerpo modificado. Por tanto, la divulgación contempla una ABM variante (por ejemplo, una ABM con afinidad madurada) que se une al CEA unido a membrana, que comprende una región Fc o región equivalente a una región Fc que tiene glicosilación alterada como resultado del cambio del nivel de expresión de un gen de glicosiltransferasa en la célula hospedadora productora de ABM. En un modo de realización específico, el cambio en el nivel de expresión génica es un aumento de la actividad de GnTIII. El aumento de la actividad de GnTIII da como resultado un aumento en el porcentaje de oligosacáridos bisectados, así como una disminución en el porcentaje de residuos de fucosa, en la región Fc de la ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, tiene una mayor afinidad de unión al receptor Fc y una mayor función efectora.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para producir una ABM anti-CEA como se describe en el presente documento que tiene oligosacáridos modificados, que comprende (a) cultivo de una célula hospedadora modificada por ingeniería genética para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa en condiciones que permiten la producción de una ABM como se describe en el presente documento, en el que dicho polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa se expresa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicha ABM producida por dicha célula hospedadora; y (b) aislamiento de dicha ABM. En un modo de realización, el polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa es GnTIII. En otro modo de realización, hay dos polipéptidos que tienen actividad glicosiltransferasa. En un modo de realización particular, los dos péptidos que tienen actividad glicosiltransferasa son GnTIII y ManII. En otro modo de realización, el

polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En un modo de realización más específico, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización de Golgi de un polipéptido residente en Golgi. Preferentemente, el dominio de localización de Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o GnTI. De forma alternativa, el dominio de localización de Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de la α 1-6-fucosiltransferasa del núcleo. Las ABM producidas por los procedimientos descritos en el presente documento tienen una afinidad de unión al receptor Fc aumentada y/o una función efectora aumentada. En general, la función efectora aumentada es una o más de las siguientes: aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc (incluyendo un aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), aumento de la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), aumento de la secreción de citocinas, aumento de la captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de la transducción directa de señales que induce apoptosis, aumento de la reticulación de anticuerpos unidos a la diana, aumento de la maduración de células dendríticas o aumento de la activación de linfocitos T. El aumento de la afinidad de unión al receptor Fc es preferentemente un aumento de la unión a los receptores de activación de Fc tales como Fc γ RIIIa. En un modo de realización particularmente preferente, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

En un modo de realización, el porcentaje de oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos bisectados en la región Fc de la ABM es al menos de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 50 %, más específicamente, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90-95 % del total de oligosacáridos. En otro modo de realización más, la molécula de unión a antígeno o molécula de unión a antígeno variante producida por los procedimientos descritos en el presente documento tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos por los procedimientos descritos en el presente documento. En un modo de realización, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es al menos de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 50 %, al menos de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 70 %, y más específicamente, al menos aproximadamente un 75 %. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser del tipo híbrido o complejo. En otro modo de realización más, la molécula de unión a antígeno o molécula de unión a antígeno variante producida por los procedimientos descritos en el presente documento tiene una mayor proporción de oligosacáridos bisectados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos por los procedimientos descritos en el presente documento. En un modo de realización, el porcentaje de oligosacáridos bisectados es al menos de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 50 %, al menos de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 70 %, y más específicamente, al menos aproximadamente un 75 %. En un modo de realización particularmente preferente, la ABM producida por las células hospedadoras y por los procedimientos descritos en el presente documento tiene una mayor proporción de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc. Los oligosacáridos no fucosilados bisectados pueden ser híbridos o complejos. Específicamente, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para producir moléculas de unión a antígeno en las que al menos de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 15 %, más específicamente al menos de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 50 %, más específicamente al menos de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 25 %, y más específicamente de al menos aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 35 % de los oligosacáridos en la región Fc de la molécula de unión a antígeno o molécula de unión a antígeno variante son bisectados y no fucosilados. Las ABM descritas en el presente documento también pueden comprender una región Fc en la que al menos de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 15 %, más específicamente al menos de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 25 %, y más específicamente al menos de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 35 % de los oligosacáridos en la región Fc de la ABM son híbridos bisectados no fucosilados.

En otro modo de realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión a antígeno anti-CEA (por ejemplo, una ABM variante) modificada por ingeniería genética para tener una función efectora aumentada y/o una afinidad de unión al receptor Fc aumentada, producida mediante los procedimientos descritos en el presente documento. La función efectora aumentada puede incluir, sin limitación, una o más de las siguientes: aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc (incluyendo un aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), aumento de la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), aumento de la secreción de citocinas, aumento de la captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de la transducción directa de señales que induce apoptosis, aumento de la reticulación de anticuerpos unidos a la diana, aumento de la maduración de células dendríticas o aumento de la activación de linfocitos T. En un modo de realización preferente, la afinidad de unión al receptor Fc aumentada es un aumento de la unión a un receptor activador de Fc, lo más preferentemente Fc γ RIIIa. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno o la molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En un modo de realización particularmente preferente, la molécula de unión a antígeno o molécula de unión a antígeno variante es un anticuerpo humanizado con afinidad madurada.

La presente divulgación proporciona además procedimientos para la generación y uso de sistemas de células hospedadoras para la producción de glicofomas de las ABM descritas en el presente documento, que tienen afinidad de unión al receptor Fc incrementada, preferentemente unión incrementada a receptores activadores de Fc, y/o que tienen funciones efectoras incrementadas, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La metodología de glicoingeniería que se puede usar con las ABM descritas en el presente documento se ha descrito con mayor detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, la publicación de la solicitud de la patente de EE. UU. n.º 2004/0241817 A1, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0175884 A1, la solicitud de patente de EE. UU. provisional n.º 60/441.307 y el documento WO 2004/065540. De forma alternativa, las ABM descritas en el presente documento se pueden modificar por glicoingeniería para reducir el número de residuos de fucosa en la región Fc de acuerdo con las técnicas divulgadas en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157108 (Genentech), o en los documentos EP 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (Kyowa). Las ABM modificadas por glicoingeniería como se describen en el presente documento también se pueden producir en sistemas de expresión que producen glicoproteínas modificadas, tales como las que se enseñan en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 60/344.169 y el documento WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) o en los documentos WO 2004/057002 y WO 2004/024927 (Greenovation).

Generación de líneas celulares para la producción de proteínas con patrón de glicosilación alterado

En un aspecto, la presente divulgación proporciona sistemas de expresión de células hospedadoras para la generación de las ABM descritas en el presente documento que tienen patrones de glicosilación modificados. En particular, la presente divulgación proporciona sistemas de células hospedadoras para la generación de glicofomas de las ABM descritas en el presente documento que tienen un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la divulgación proporciona sistemas de expresión de células hospedadoras seleccionados o modificados por ingeniería para expresar un polipéptido que tiene una actividad glicosiltransferasa. En un modo de realización específico, la actividad glicosiltransferasa es una actividad GnTIII. En un modo de realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización de Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi. Específicamente, dichos sistemas de expresión de células hospedadoras pueden modificarse genéticamente para que comprendan una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene GnTIII, unido operativamente a un sistema promotor constitutivo o regulado.

En un modo de realización específico, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora que se ha modificado genéticamente para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización de Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi. En un aspecto, la célula hospedadora se modifica por ingeniería genética con una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización de Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi.

En general, cualquier tipo de línea celular cultivada, incluyendo las líneas celulares analizadas anteriormente, se puede usar como base para diseñar las líneas de células hospedadoras descritas en el presente documento. En un modo de realización preferente, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales se usan como la línea celular de base para generar las células hospedadoras modificadas genéticamente descritas en el presente documento.

Se contempla que la divulgación englobe cualquier célula hospedadora modificada por ingeniería genética que exprese un polipéptido que tenga actividad glicosiltransferasa, por ejemplo, actividad GnTIII, incluyendo un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización de Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi como se define en el presente documento.

Uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa, por ejemplo, actividad GnTIII, pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, de forma alternativa, un sistema de expresión regulado. Dichos sistemas son bien conocidos en la técnica e incluyen los sistemas analizados anteriormente. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos de fusión que tienen actividad glicosiltransferasa, por ejemplo, actividad GnTIII, y que comprenden el dominio de localización de Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo están comprendidos dentro del sistema de la célula hospedadora, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que tienen actividad glicosiltransferasa, por ejemplo, actividad GnTIII, se determinan por procedimientos generalmente conocidos en la técnica, incluyendo análisis de inmunoelectrotransferencia, análisis de transferencia Northern, análisis de la expresión de genes indicadores o medición de la actividad glicosiltransferasa, por ejemplo, actividad GnTIII. De forma alternativa, puede emplearse una lectina que se une a productos biosintéticos de la GnTIII, por ejemplo, lectina E₄-PHA. De forma alternativa, se puede usar un ensayo funcional que mide la unión incrementada al receptor Fc o la función efectora aumentada mediada por anticuerpos producidos por las células modificadas por ingeniería genética con el ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad glicosiltransferasa, por ejemplo, actividad GnTIII.

Identificación de transfectantes o transformantes que expresan la proteína que tiene un patrón de glicosilación modificado

5 Las células hospedadoras que contienen la secuencia codificante de una ABM anti-CEA variante (por ejemplo, una ABM humanizada, con afinidad madurada y/o con estabilidad madurada) y que expresan los productos génicos biológicamente activos se pueden identificar mediante al menos cuatro procedimientos generales: (a) hibridación ADN-ADN o ADN-ARN; (b) presencia o ausencia de funciones génicas «marcadoras»; (c) evaluación del nivel de transcripción medido por la expresión de los respectivos transcritos de ARNm en la célula hospedadora; y (d) detección del producto génico medido por inmunoensayo o por su actividad biológica.

10 En el primer procedimiento, la presencia de la secuencia codificante de un anti-CEA variante y/o la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa (por ejemplo, GnTIII) puede detectarse mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN utilizando sondas que comprenden secuencias nucleotídicas que son homólogas a las respectivas secuencias codificantes, respectivamente, o partes o derivados de las mismas.

15 En el segundo procedimiento, el sistema de hospedadores/vectores de expresión recombinantes puede identificarse y seleccionarse en función de la presencia o ausencia de ciertas funciones génicas «marcadoras» (por ejemplo, actividad timidina-cinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia codificante de la ABM descrita en el presente documento, o un fragmento de la misma, y/o la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa (por ejemplo, GnTIII) se insertan dentro de una secuencia génica marcadora del vector, los recombinantes que contienen las respectivas secuencias codificantes pueden identificarse por la ausencia de la función génica marcadora. De forma alternativa, un gen marcador se puede colocar en tándem con las secuencias codificantes bajo el control del mismo o diferente promotor usado para controlar la expresión de las secuencias codificantes. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia codificante de la ABM y/o la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa (por ejemplo, GnTIII).

20 En el tercer procedimiento, la actividad transcripcional para la región codificante de la ABM descrita en el presente documento, o un fragmento de la misma, y/o la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa (por ejemplo, GnTIII) pueden evaluarse mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, el ARN puede aislarse y analizarse mediante transferencia Northern usando una sonda homóloga a las secuencias codificantes de la ABM descrita en el presente documento, o un fragmento de la misma, y/o la secuencia codificante del polipéptido que tiene actividad glicosiltransferasa (por ejemplo, GnTIII) o partes particulares del mismo. De forma alternativa, los ácidos nucleicos totales de la célula hospedadora se pueden extraer y su hibridación con dichas sondas se puede analizar.

25 En el cuarto procedimiento, la expresión de los productos proteicos puede evaluarse inmunológicamente, por ejemplo, mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia, inmunoensayos tales como radioinmuno precipitación, inmunoensayos ligados a enzimas y similares. La última prueba del éxito del sistema de expresión, sin embargo, implica la detección de los productos génicos biológicamente activos.

Aplicaciones terapéuticas y procedimientos de uso de moléculas de unión a antígeno anti-CEA

45 La divulgación también se refiere a un procedimiento para seleccionar células *in vivo* o *in vitro* que expresan el CEA. Las células que expresan el CEA pueden seleccionarse para fines terapéuticos (por ejemplo, para tratar un trastorno actuando sobre las células que expresan el CEA para su destrucción por el sistema inmunitario). En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para actuar sobre células que expresan el CEA en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una ABM como se describe en el presente documento. Las células que expresan el CEA también pueden seleccionarse para fines de diagnóstico (por ejemplo, para determinar si expresan el CEA, normalmente o de forma anormal). Por lo tanto, la divulgación también se refiere a procedimientos para detectar la presencia del CEA o una célula que expresa el CEA, *in vivo* o *in vitro*. Un procedimiento para detectar la expresión del CEA de acuerdo con la presente divulgación comprende poner en contacto una muestra que se someterá a prueba, opcionalmente con una muestra de control, con una ABM como se describe en el presente documento, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre la ABM y el CEA. La formación del complejo se detecta a continuación (por ejemplo, mediante ELISA u otros procedimientos conocidos en la técnica). Cuando se usa una muestra de control con la muestra de ensayo, cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos de ABM y CEA cuando se comparan las muestras de ensayo y de control es indicativa de la presencia del CEA en la muestra de ensayo.

60 En un aspecto, las ABM y/o ABM variantes como se describen en el presente documento pueden usarse para seleccionar células *in vivo* o *in vitro* que expresan el CEA. Las células que expresan el CEA pueden seleccionarse con fines de diagnóstico o terapéuticos. En un aspecto, las ABM descritas en el presente documento pueden usarse para detectar la presencia de CEA en una muestra. El CEA se expresa anormalmente (por ejemplo, se sobreexpresa) en muchos tumores humanos en comparación con el tejido no tumoral del mismo tipo de célula. Por lo tanto, las ABM y/o

ABM variantes descritas en el presente documento son particularmente útiles en la prevención de la formación de tumores, la erradicación de tumores y la inhibición del crecimiento tumoral o metástasis. Las ABM y/o ABM variantes descritas en el presente documento también actúan para detener el ciclo celular, provocar la apoptosis de las células diana (por ejemplo, células tumorales) e inhibir la angiogénesis y/o la diferenciación de las células diana. Las ABM y/o ABM variantes descritas en el presente documento pueden usarse para tratar cualquier tumor que exprese el CEA. Las neoplasias malignas particulares que se pueden tratar con las ABM y/o ABM variantes descritas en el presente documento incluyen, sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer de páncreas y cáncer de mama.

Las ABM y/o ABM variantes anti-CEA divulgadas en el presente documento pueden usarse solas para inhibir el crecimiento tumoral o destruir células tumorales. Por ejemplo, las ABM anti-CEA pueden unirse al CEA que está en la membrana o superficie celular de las células cancerosas y provocar, por ejemplo, la destrucción de las células cancerosas mediada por la ADCC u otros efectores. Las ABM y/o ABM variantes anti-CEA se pueden humanizar, específicamente, con afinidad y/o estabilidad madurada, más específicamente, modificadas con glicoingeniería y con estabilidad y afinidad maduras.

Las ABM y/o ABM variantes pueden usarse de forma alternativa solas para bloquear la actividad del antígeno CEA, particularmente interfiriendo físicamente con su unión de otro compuesto. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno y las moléculas de unión a antígeno variantes se pueden usar para bloquear la adhesión celular mediada por el CEA.

Las ABM y/o ABM variantes anti-CEA descritas en el presente documento se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las que se analizan a continuación, incluyendo las que pueden administrarse a un ser humano por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Las ABM también se administran adecuadamente por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Se prevé que la vía intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores colorrectales.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de ABM y/o ABM variante dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, el tratamiento previo, los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el juicio del médico tratante. La ABM se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para destruir selectivamente células tumorales que expresan el CEA. Este procedimiento comprende hacer reaccionar las moléculas de unión a antígeno o los conjugados (por ejemplo, la inmunotoxina) descritos en el presente documento con dichas células tumorales. Estas células tumorales pueden ser de un carcinoma humano, incluyendo carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma gástrico, carcinoma pancreático y carcinoma de mama.

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento que inhibe la adhesión celular mediada por el CEA de una célula tumoral. Este procedimiento comprende poner en contacto dicha célula tumoral con las moléculas de unión a antígeno o las moléculas de unión a antígeno variantes descritas en el presente documento o los conjugados de las mismas. Estas células tumorales pueden ser células humanas, incluyendo células de cáncer colorrectal, células de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), células de cáncer gástrico, células de cáncer de páncreas y células de cáncer de mama.

Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar carcinomas (por ejemplo, carcinomas humanos) *in vivo*. Este procedimiento comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que contiene al menos una de las moléculas de unión a antígeno o los inmunoconjugados (por ejemplo, la inmunotoxina) descritos en el presente documento.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un procedimiento para tratar cánceres caracterizados por la sobreexpresión del CEA, incluyendo, sin limitación, células de cáncer colorrectal, CPNM (cáncer de pulmón no microcítico), células de cáncer gástrico, células de cáncer de páncreas y células de cáncer de mama, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno o moléculas de unión a antígeno variantes anti-CEA divulgadas en el presente documento.

En un modo de realización adicional, la divulgación se refiere a un procedimiento para inducir la regresión de tejido tumoral en un sujeto usando moléculas de unión a antígeno o moléculas de unión a antígeno variantes anti-CEA divulgadas en el presente documento. Los ejemplos no limitantes del tejido tumoral incluyen tumor colorrectal, tumor de pulmón no microcítico, tumor gástrico, tumor pancreático y tumor de mama. En un modo de realización particular, el tejido tumoral es un tumor colorrectal.

De acuerdo con la práctica de esta divulgación, el sujeto puede ser un sujeto humano, equino, porcino, bovino, murino,

canino, felino y aviar. Otros animales de sangre caliente también se incluyen en esta divulgación.

La divulgación proporciona además procedimientos para inhibir el crecimiento de células tumorales, tratar un tumor en un sujeto y tratar una enfermedad de tipo proliferativo en un sujeto. Estos procedimientos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de moléculas de unión al antígeno o moléculas de unión a antígeno variantes anti-CEA divulgadas en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad relacionada con la expresión anormal del CEA. En un modo de realización particular, la enfermedad es un cáncer que sobreexpresa el CEA, incluyendo, sin limitación, tumor colorrectal, tumor de pulmón no microcítico, tumor gástrico, tumor pancreático y tumor de mama. En un modo de realización particular, el tumor es un tumor colorrectal.

Conjugados de la molécula de unión a antígeno anti-CEA

La divulgación también proporciona inmunoconjugados que comprenden una ABM o ABM variante anti-CEA del presente documento conjugada con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteína, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o isótopos radiactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, incluyendo, sin limitación, un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos del fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4.336-4343 (2002) y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende una ABM o ABM variante anti-CEA como se describe en el presente documento conjugada con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, sin limitación, la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos no unidos de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende una ABM o ABM variante anti-CEA como se describe en el presente documento conjugada con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo, Tc^{99m} o I¹²³, o un marcador de espín para las pruebas de imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen-triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo (véase el documento WO94/11026). El enlazador puede ser un «enlazador escindible» que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil en medio ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC del presente documento contemplan expresamente, pero sin limitación, conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS,

MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

5 Composiciones, formulaciones, dosificaciones y vías de administración

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las ABM o ABM variantes anti-CEA descritas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación se refiere además al uso de dichas composiciones farmacéuticas en el procedimiento de tratamiento de enfermedades, tales como cáncer, o en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer. Específicamente, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades, y más particularmente, para el tratamiento del cáncer, comprendiendo el procedimiento la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en el presente documento.

En un aspecto, la presente divulgación abarca composiciones farmacéuticas, combinaciones y procedimientos para tratar carcinomas humanos, por ejemplo, carcinoma colorrectal. Por ejemplo, la divulgación incluye composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de carcinomas humanos que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de ABM descritas en el presente documento pueden administrarse usando modos de administración convencionales, incluyendo, sin limitación, administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o directamente en el tumor. Es preferente la administración intravenosa.

En un aspecto de la divulgación, las formulaciones terapéuticas que contienen las ABM descritas en el presente documento se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son atóxicos para los consumidores en las dosis y concentraciones empleadas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

El modo de administración y régimen de dosificación más eficaces para las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento dependen de la gravedad y la evolución de la enfermedad, la salud del paciente y la respuesta al tratamiento y el juicio del médico tratante. En consecuencia, las dosificaciones de las composiciones deben ajustarse al paciente individual. No obstante, una dosis eficaz de las composiciones descritas en el presente documento generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2000 mg/kg.

Las moléculas descritas en el presente documento pueden estar en una variedad de formas de dosificación que incluyen, sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferente depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

La composición que comprende una ABM como se describe en el presente documento se formula, dosifica y administra en consonancia con la buena práctica médica. Los factores que se deben considerar en este contexto incluyen la enfermedad o trastorno particular que se vaya a tratar, el mamífero particular que se vaya a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa de la enfermedad o trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista que se va a administrar se registrará por dichas consideraciones.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o en combinación con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo como se describe en el presente documento. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este modo de realización de la divulgación puede

comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicional, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoc conjugado como se describe en el presente documento en lugar de o además de una ABM anti-CEA.

Ejemplos

A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de las posiciones de residuos de aminoácidos específicos en los siguientes ejemplos están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Ejemplo 1

Generación de bibliotecas para maduración de la afinidad

Biblioteca H1/H2

Para la generación de una biblioteca para la maduración de la afinidad aleatorizada en la región HCDR1 y HCDR2, se aleatorizaron tripletes que codifican las posiciones F32, G33 en CDR1 y las posiciones W50, N52, T52a, K52b, T54, E56, T58 en CDR2. En una primera etapa, se amplificó un fragmento de ADN (fragmento 1) usando pMS22 como molde y cebadores MS-43 (SEQ ID NO: 123) y EAB-679 (SEQ ID NO: 127) que contiene las posiciones aleatorizadas de CDR1 (figura 11). Usando el mismo molde, los cebadores MS-56 (SEQ ID NO: 126) y MS-52 (SEQ ID NO: 124) amplificaron un segundo fragmento (fragmento 2) que tiene una región de solapamiento con el extremo 3' del fragmento 1. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 25 ciclos, cada uno de los cuales consistía en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 20 y 50 segundos a 72 °C, para el fragmento 1 y el fragmento 2, respectivamente. Se realizó una etapa de incubación final de 10 min a 72 °C al final. Ambos fragmentos se purificaron en un gel de agarosa. Una PCR de extensión con solapamiento con el fragmento 1 y 2 usando los cebadores MS-43 (SEQ ID NO: 123) y EAB-680 (SEQ ID NO: 128), que albergaban posiciones aleatorizadas de CDR2, generó un fragmento con ambas CDR aleatorizadas (fragmento 3). Para el ensamblaje de los fragmentos 1 y 2 se usaron cantidades equimolares del fragmento 1 y el fragmento 2. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 40 segundos a 72 °C. Después de la adición de los cebadores externos, se realizaron 20 ciclos adicionales usando los mismos parámetros. Un cuarto fragmento (fragmento 4) que se solapa con la región 3' del fragmento 3 se amplificó por PCR usando nuevamente pMS22 como molde y cebadores MS-55 (SEQ ID NO) y MS-52 (SEQ ID NO: 124). Después de la purificación en gel, una PCR de extensión con solapamiento final usando el fragmento 3 y 4 como moldes y cebadores MS-43 y MS-52 generó un fragmento que contenía CL y partes de VH. Para ello, se usaron cantidades equimolares del fragmento 3 y el fragmento 4. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 80 segundos a 72 °C. Después de la adición de los cebadores externos, se realizaron 20 ciclos adicionales usando los mismos parámetros. El fragmento resultante se purificó a continuación en gel y se ligó en pMS22 después de la hidrólisis con NcoI/NheI.

Biblioteca L1/L2

Para la generación de una biblioteca para la maduración de la afinidad aleatorizada en la región LCDR1 y LCDR2, se aleatorizaron tripletes que codifican las posiciones Q27, N28, V29, G30, T31, N32 en CDR1 y las posiciones Y49 S50, Y53, R54, Y55, S56 en CDR2. En una primera etapa, se amplificó un fragmento de ADN (fragmento 1) usando pMS22 como molde y cebadores EAB-685 (SEQ ID NO: 129) y EAB-681 (SEQ ID NO: 133) que contiene las posiciones aleatorizadas de CDR1 (figura 12). Usando el mismo molde, los cebadores EAB-686 (SEQ ID NO: 130) y EAB-687 (SEQ ID NO: 131) amplificaron un segundo fragmento (fragmento 2) que tiene una región de solapamiento con el extremo 3' del fragmento 1. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 25 ciclos, cada uno de los cuales consistía en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72 °C, para el fragmento 1 y el fragmento 2, respectivamente. Se realizó una etapa de incubación final de 10 min a 72 °C al final. Ambos fragmentos se purificaron en un gel de agarosa. Una PCR de extensión con solapamiento con el fragmento 1 y 2 usando los cebadores EAB-685 (SEQ ID NO: 129) y EAB-682 (SEQ ID NO: 134), que albergaban posiciones aleatorizadas de CDR2, generó un fragmento con ambas CDR aleatorizadas (fragmento 3). Para el ensamblaje de los fragmentos 1 y 2 se usaron cantidades equimolares del fragmento 1 y el fragmento 2. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo

en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72 °C. Después de la adición de los cebadores externos, se realizaron 20 ciclos adicionales usando los mismos parámetros. Un cuarto fragmento (fragmento 4) que se solapa con la región 3' del fragmento 3 se amplificó por PCR usando nuevamente pMS22 como molde y cebadores EAB-688 (SEQ ID NO: 132) y EAB-687 (SEQ ID NO: 131). Después de la purificación en gel, una PCR de extensión con solapamiento final usando el fragmento 3 y 4 como moldes y cebadores EAB-685 (SEQ ID NO: 129) y EAB-687 (SEQ ID NO: 131) generó un fragmento que contenía VL y partes de CL. Para ello, se usaron cantidades equimolares del fragmento 3 y el fragmento 4. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 80 segundos a 72 °C. Después de la adición de los cebadores externos, se realizaron 20 ciclos adicionales usando los mismos parámetros. Este fragmento se ligó a continuación en pMS22 después de la hidrólisis con HindIII/SacI.

Bibliotecas H3

Para la generación de bibliotecas para la maduración de la afinidad aleatorizadas en la región HCDR3, se aleatorizaron tripletes que codifican las posiciones W95, D96, F97, Y98, D99, Y100, V100a, E100b, A100c y M100d en dos enfoques diferentes: (1) aleatorización de todo el segmento (biblioteca completa de H3) o (2) aleatorización individual de cada posición que da como resultado diez subbibliotecas. Las subbibliotecas que contienen clones con posiciones individualmente aleatorizadas se combinaron después de la transformación en bacterias (biblioteca combinada H3). Para la aleatorización de la región HCDR3, los fragmentos se amplificaron por PCR usando un cebador que se hibridó en el extremo 3' de CL y cebadores que albergaban las secuencias aleatorizadas de HCDR3 (figura 13). A continuación, se realizó una PCR de extensión con solapamiento con un segundo fragmento que se solapa con el extremo 3' del fragmento 1, y comprende el extremo de VH y la región 5' de CH1. Los fragmentos ensamblados se ligaron a continuación en pMS22 después de la hidrólisis con SacI/NheI. Para la generación de la biblioteca combinada H3, se amplificaron por PCR por separado 10 fragmentos de ADN usando cada uno de los cebadores AC7-AC16 (SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 144) en combinación con el cebador EAB-749 (SEQ ID NO: 146). Para la generación de la biblioteca completa L3, se usaron los cebadores AC17 (SEQ ID NO: 145) y EAB-749 (SEQ ID NO: 146). El plásmido pMS22 se usó como molde. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 25 ciclos, cada uno de los cuales consistía en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C, y una etapa de alargamiento de 36 segundos a 72 °C, seguida por una etapa final de incubación de 10 min a 72 °C. Esto dio como resultado fragmentos de aproximadamente 580 pb de longitud que se purificaron en un gel de agarosa. Para la PCR de extensión con solapamiento, se amplificó un segundo fragmento usando el cebador EAB-750 (SEQ ID NO: 147) o EAB-751 (SEQ ID NO: 148) en combinación con EAB-752 (SEQ ID NO: 149). Mientras que el cebador EAB-750 (SEQ ID NO: 147) tenía una secuencia solapante con los cebadores de aleatorización AC7-11 (SEQ ID NO: 139), EAB-751 (SEQ ID NO: 148) compartió homología de secuencia con los cebadores de aleatorización AC12-17 (SEQ ID NO: 140-145). Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 25 ciclos, cada uno de los cuales consistía en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 12 segundos a 72 °C, seguida por una etapa final de incubación de 10 min a 72 °C. Los fragmentos resultantes tenían aproximadamente 180 pb de longitud. Para el ensamblaje de ambos fragmentos se usaron cantidades equimolares del fragmento 1 y el fragmento 2 correspondiente. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72 °C. Después de la adición de los cebadores externos EAB-749 (SEQ ID NO: 146) y EAB-752 (SEQ ID NO: 149), se realizaron 20 ciclos adicionales usando los mismos parámetros. Al final, se realizó una etapa final de incubación de 10 min a 72 °C. Los fragmentos purificados en gel se ligaron a continuación en pMS22 después de la hidrólisis con SacI/NheI y los ligados purificados se transformaron en bacterias TG1 por electroporación.

Bibliotecas L3

Para la generación de bibliotecas para la maduración de la afinidad aleatorizadas en la región CDR3 de la cadena ligera, se aleatorizaron tripletes que codifican las posiciones Y91, Y92, T93, Y94 y L95a a lo largo del segmento (biblioteca completa L3) o individualmente dando como resultado cinco subbibliotecas. Las subbibliotecas que contienen clones con posiciones individualmente aleatorizadas se combinaron después de la transformación en bacterias (biblioteca combinada L3). Para la generación de las cinco subbibliotecas se amplificaron por PCR cinco fragmentos de ADN usando cada uno de los cebadores AC1-AC5 (SEQ ID NO: 150-154) en combinación con el cebador MS43 (SEQ ID NO: 123). Para la generación de la biblioteca completa L3 se usaron la combinación de cebadores AC6 (SEQ ID NO: 155) y MS43 (SEQ ID NO: 123) (figura 14). El plásmido pMS22 se usó como molde. Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa de incubación inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 25 ciclos, cada uno de los cuales consistía en una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una etapa de hibridación de 1 min a 55 °C y una etapa de alargamiento de 25 segundos a 72 °C, seguida por una etapa final de incubación de 10 min a 72 °C. Los fragmentos resultantes que abarcan las posiciones 1-104 del dominio VL se purificaron en un gel de agarosa y se usaron como molde para una amplificación por PCR adicional. Todas las reacciones se realizaron con el cebador EAB-746 (SEQ ID NO: 156) que tiene una secuencia solapante con los cebadores de aleatorización y MS43 (SEQ ID NO: 123) usando las mismas condiciones descritas anteriormente. Los fragmentos purificados, así como pMS22, se

hidrolizaron con NcoI/XhoI. Para las cinco subbibliotecas, se ligaron 0,5 µg de inserto con 0,5 µg de pAC16. Para la biblioteca completa de L3, el ligado se realizó con 9,8 µg de inserto y 9,8 µg de pMS22. Los ligados purificados se transformaron en bacterias TG1 mediante electroporación.

5 Generación de los antígenos

Debido a que los anticuerpos PR1A3 tanto murinos como humanizados reconocen solo el CEA humano soluble unido a la membrana pero no el circulante, se generó una proteína quimérica recombinante que contiene el epítipo de PR1A3 para la maduración de la afinidad *in vitro* de PR1A3 humanizado (SEQ ID NO: 7 y 8). La generación de esta proteína híbrida se realizó como se describe en Steward et al., 1999. En resumen, la secuencia de ADN del dominio B de la glicoproteína biliar humana (BGP) se reemplazó con la secuencia del dominio CEA-B3 humano, que contiene el epítipo de PR1A3. Como resultado, la secuencia codifica una proteína híbrida que comprende los dominios N y A1 de BGP, el dominio B3 de CEA y el dominio A2 de BGP (N-A1-B3-A2, huNABA). Este producto de fusión se unió a continuación a la parte Fc de IgG1 humana (huNABA-Fc) (Steward et al., Cancer Immunol Immunother, 47:299-306, 1999) o se fusionó con una secuencia que codifica el sitio de escisión de la proteasa de precisión, una etiqueta avi y una etiqueta (His)6 (huNABA-avi-his) (SEQ ID NO: 158). huNABA-Fc se purificó a partir del sobrenadante de una línea celular CHO establemente transfectada usando una columna de proteína A. huNABA-avi-his (SEQ ID NO: 158) se transfectó transitoriamente en células HEK 293, que expresan de forma estable la proteína EBNA derivada de EBV. Un plásmido cotransfectado simultáneamente que codifica una biotina ligasa permitió la biotilación específica de la etiqueta avi *in vivo*. La proteína se purificó a continuación mediante cromatografía de afinidad en metal inmovilizado (IMAC) seguida de filtración en gel.

Maduración de la afinidad de PR1A3 humanizado

La generación de Fab PR1A3 humanizado con afinidad madurada se llevó a cabo mediante presentación en fagos usando protocolos estándar (Silacci et al, Proteomics, 5(9):2340-2350,2005). Las selecciones con todas las bibliotecas para la maduración de la afinidad se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente procedimiento: 1. unión de ~1012 partículas de fagémidos de cada biblioteca para la maduración de la afinidad a huNABA-avi-his biotilado 100 nM durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml; 2. captura de huNABA-avi-his biotilado y de las partículas de fagos específicamente unidas mediante la adición de $5,4 \times 10^7$ perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina durante 10 min; 3. lavado de perlas usando $5-10 \times 1$ ml de PBS/Tween20 y $5-10 \times 1$ ml de PBS; 4. elución de las partículas de fagos mediante la adición de 1 ml de TEA (trietilamina) 100 mM durante 10 min y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris/HCl 1 M a pH 7,4; y 5. reinfección con bacterias *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial, infección por el fago auxiliar VCSM13 y posterior precipitación en PEG/NaCl de partículas de fagémidos para su uso en las rondas de selección subsiguientes. Las selecciones se llevaron a cabo en 3-5 rondas usando concentraciones de antígeno constantes o decrecientes (de 10^{-7} M a 2×10^{-9} M). En la ronda 2, captura de los complejos fago:antígeno se realizó usando placas de neutravidina en lugar de perlas de estreptavidina. Los fijadores específicos se identificaron mediante ELISA de la siguiente manera: se recubrieron 100 µl de huNABA-avi-his biotilado 10 nM por pocillo en placas de neutravidina. Se añadieron sobrenadantes bacterianos que contenían Fab y se detectaron Fab de unión a través de sus etiquetas Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que dieron positivo en ELISA se expresaron bacterianamente como fragmentos Fab solubles en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se sometieron a un experimento de cribado cinético mediante análisis SPR usando BIACORE T100. Se identificaron los clones que expresan Fab con las constantes de afinidad más altas y se secuenciaron los fagémidos correspondientes.

45 Purificación de Fab y medición de los parámetros cinéticos

Para el análisis exacto de los parámetros cinéticos, los Fab se purificaron a partir de cultivos bacterianos. Un cultivo de 500 ml se inoculó e indujo con IPTG 1 mM a una OD600 de 0,9. Las bacterias se incubaron a 25 °C durante la noche y se recogieron por centrifugación. Después de la incubación del sedimento resuspendido durante 20 min en 25 ml de tampón PPB (Tris-HCl 30 mM, pH 8, EDTA 1 mM, sacarosa al 20 %), las bacterias se centrifugaron de nuevo y se recogió el sobrenadante. Esta etapa de incubación se repitió una vez con 25 ml de una solución de MgSO₄ 5 mM. Los sobrenadantes de ambas etapas de incubación se combinaron, filtraron y cargaron en una columna IMAC (His gravitrap, GE Healthcare). Posteriormente, la columna se lavó con 40 volúmenes. Después de la elución (NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4), el eluido se volvió a tamponar utilizando columnas PD10 (GE Healthcare). Los parámetros cinéticos de los Fab purificados se estudiaron entonces por análisis SPR en una fila de dilución que variaba de 200 nM a 6,25 nM.

Ejemplo 2

60 El anticuerpo PR1A3 se quimerizó para tener una región constante IgG1/kappa humana, y se expresó usando la tecnología GylcoMab para tener un alto grado de azúcares afucosilados en el Fc. Los anticuerpos modificados por glicoingeniería y no modificados por glicoingeniería se compararon a una relación efector:diana de 25:1. La cantidad máxima de destrucción de células diana dependiente de anticuerpos se duplicó mediante glicoingeniería de la región Fc (figura 2). Se logró un aumento adicional de la destrucción celular al aumentar la relación efector:diana (figura 2).

65 PR1A3 se humanizó utilizando estructuras idénticas a las secuencias de la línea germinal humana. La secuencia IMGT

IGHV7-4-1*02 (n.º de registro X62110) era el aceptor para VH humanizado e IMGT_hVK_1_39 (n.º de registro X59315) era el aceptor para la humanización de VL. Un anticuerpo humanizado PR1A3 que comprende una construcción de región variable de cadena pesada CH7A y una construcción de región variable de cadena ligera CL1A mostró una unión satisfactoria a células de carcinoma de colon humano medida por citometría de flujo (figura 3).

La maduración de la afinidad de PR1A3 mediante presentación en fagos se realizó usando protocolos estándar como se describe en detalle en el ejemplo 1 del presente documento. El anticuerpo PR1A3 humanizado original que se usó para la maduración de la afinidad comprende una construcción de región variable de cadena pesada CH7A y una construcción de región variable de cadena ligera CL1A. Las tablas 3-6 a continuación muestran las bibliotecas utilizadas para la maduración de la afinidad. Para la biblioteca L1/L2, las posiciones valina 29, alanina 50 o serina 51 dentro de las CDR se mantuvieron constantes. Para la biblioteca H1/H2, las posiciones isoleucina 51, glicina 55 o alanina 57 dentro de las CDR se mantuvieron constantes (figuras 4 y 5).

Una construcción de región variable de cadena pesada con afinidad madurada, CH7A rF9 y una construcción de región variable de cadena ligera con afinidad madurada, CL1A rH11, se emparejaron con la construcción de región variable de cadena ligera y la construcción de región variable de cadena pesada originales, respectivamente, y entre sí. Todos los anticuerpos se convirtieron en IgG1/kappa humana y la unión a la línea celular positiva para CEA MKN45 se midió mediante citometría de flujo. Los anticuerpos que comprenden una o ambas regiones variables de cadena pesada o ligera con afinidad madurada mostraron características de unión mejoradas en comparación con el anticuerpo original humanizado (figura 6). Las figuras 6, 10 y 15 muestran varios ejemplos en los que las cadenas ligeras y pesadas maduras contribuyen independientemente a una afinidad incrementada. El anticuerpo original CH7A CL1A tiene la intensidad de señal más baja, así como el valor de CE_{50} más alto en las figuras 6 y 15. La cadena ligera madurada desplaza los valores de CE_{50} a números menores, mientras que las cadenas pesadas maduras (rF9 en la figura 6 y rB9 en la figura 15) desplazan la intensidad de la señal de fluorescencia total en una medición por citometría de flujo. La figura 10 muestra las contribuciones individuales de la cadena pesada y ligera, medidas por la metodología Biacore. La combinación de estas dos cadenas aumenta la afinidad aún más. Además, como se muestra en la figura 16, la mejora de la afinidad da lugar a la mejora de las características de ADCC.

Las afinidades de unión de las CDR de cadenas pesadas y ligeras con afinidad madurada se determinaron mediante Biacore y se enumeran las figuras 34A y B.

La figura 35 resume las constantes de afinidad de las diversas secuencias de anticuerpo con afinidad madurada. El anticuerpo original PR1A3 se enumera así como varias combinaciones de cadenas ligeras y cadenas pesadas de secuencias maduras y no maduras. Todos los valores se obtuvieron mediante tecnología Biacore midiendo las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) de las diversas construcciones de anticuerpos solubles en formato Fab en un chip Biacore con reactivo NABA-avi-his inmovilizado (SEQ ID NO 158) como el antígeno. La constante de afinidad está etiquetada con K_D .

Ejemplo 3

La estructura de aceptor utilizada para generar los anticuerpos anti-CEA con afinidad madurada descritos en el ejemplo 2 era de la clase VH7 humana. Para aumentar la estabilidad, se usó una secuencia estructural de aceptor más estable como base para la modificación por ingeniería genética de la estabilidad del anticuerpo. Tomando como base la homología de secuencia del anticuerpo murino PR1A3, y el supuesto de que las secuencias derivadas de VH1 deberían tener una estabilidad intrínseca más alta que las de VH7, o los números pares de los clados VH humanos (Ewert, S., Huber, T., Honegger, A. y Plückthun, A. (2003) J. Mol. Biol., 325, 531-553), la secuencia IGHV-1-18 (n.º de registro: M99641) se usó como nueva estructura de aceptor. El injerto en bucle en CDR convencional del anticuerpo PR1A3 da lugar a la construcción CH1A (SEQ ID NO: 279). Desafortunadamente, esta molécula no mostró actividad de unión significativa hacia el antígeno CEA. La actividad de unión de esta construcción se comparó con la actividad de unión del anticuerpo quimérico PR1A3 que alberga dominios variables derivados de ratón a diversas concentraciones. Las células BxPC3 se usaron para la unión específica de los anticuerpos al CEA y la intensidad de unión se midió mediante análisis FACS (figura 17).

Para recuperar la afinidad de unión, se introdujeron varias retromutaciones en la secuencia CH1A para generar nuevas cadenas pesadas CH1A1 (SEQ ID NO: 257), CH1A2 (SEQ ID NO: 258), CH1A3 (SEQ ID NO: 259) y CH1A4 (SEQ ID NO: 260). CH1A1 incluye la mutación de punto doble M69F/T71L. Las últimas tres variantes tienen las estructuras completas 1, 2 o 3, respectivamente, reemplazadas por el homólogo murino. La figura 18 muestra la unión de esas construcciones cuando se emparejan con la cadena ligera 2F1 (SEQ ID NO: 209). En este ensayo se analizó la unión celular de las variantes de anticuerpo basadas en CH1A a células MKN-45 que expresan el CEA a diversas concentraciones. La cadena ligera con afinidad madurada 2F1 fue idéntica para todos los anticuerpos sometidos a prueba, excepto para el anticuerpo original, en el que se usó la cadena ligera original CL1A. La fluorescencia media se determinó mediante análisis FACS. La figura 19 muestra la estabilidad de esas construcciones cuando se emparejan con la cadena ligera 2F1, medida por dispersión dinámica de la luz (DLS) de las muestras. El ensayo de DLS se realizó usando 1 mg/ml de los anticuerpos en un tampón de histidina 20 mM y NaCl 140 mM a pH 6,0. El ensayo se realizó empezando a 25 °C, con un aumento de temperatura incremental de 0,05 °C/min hasta 70 °C. Todos los anticuerpos sometidos a prueba en este ensayo tenían 2F1 como cadena ligera.

Dado que CH1A1 todavía conserva la estabilidad original, y también muestra una unión significativa (pero algo menor que CH1A4, que era de la afinidad más alta, pero la estabilidad más baja), se eligió esta construcción para una mayor optimización de la unión. Se generaron nuevas cadenas pesadas CH1A1A (SEQ ID NO: 261), CH1A1B (SEQ ID NO: 262), CH1A1C (SEQ ID NO: 263), CH1A1D (SEQ ID NO: 264), CH1A1E (SEQ ID NO: 265), CH1A1F (SEQ ID NO: 266), y CH1A1G (SEQ ID NO: 267). Estas son esencialmente variantes de CH1A1 con solo unas pocas retromutaciones en la región FR1 y FR3. Las figuras 20 y 21 muestran que sus afinidades son todas similares, aunque todavía ligeramente inferiores a la construcción humanizada basada en VH7 CH7A. La figura 20 muestra los sensogramas de Proteon (Biacore) obtenidos para la unión de las variantes estructurales basadas en CH1A1 a la proteína quimérica portadora del antígeno CEA NABA. Se inmovilizó NABA biotinilada en un chip recubierto con neutravidina y se usaron anticuerpos como analitos a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 nM. El clon precursor CH1A1 y el anticuerpo original CH7A se incluyeron para una comparación directa. La cadena ligera 2F1 fue idéntica para todos los anticuerpos sometidos a ensayo. La figura 21 muestra la intensidad de unión de las siete variantes basadas en CH1A1 que llevan mutaciones estructurales adicionales. Los anticuerpos se incubaron con las células MKN45 que expresan el CEA en una serie de concentraciones y la intensidad de unión se midió mediante análisis FACS. El clon precursor CH1A1 se incluyó para una comparación directa. Todos los anticuerpos sometidos a prueba en este ensayo tenían 2F1 como cadena ligera. Las variantes CH1A1A y CH1A1B se eligieron como variantes finales de la humanización basada en VH1 basándose en sus rendimientos de purificación comparativamente mejores y en su comportamiento monomérico.

Ejemplo 4

Los residuos de CDR-H3 que se seleccionaron en el proceso de maduración de la afinidad se introdujeron individualmente en la secuencia de PR1A3 para evaluar el aumento de la estabilidad del anticuerpo (figura 36).

La figura 22 muestra las mediciones por resonancia de plasmones superficiales (SPR) de la afinidad (medida en la forma bivalente) de cada anticuerpo hacia el antígeno CEA (reactivo NABA como se describe por Stewart et al. Cancer Immunol Immunother (1999) 47:299-306). En la figura 22 se muestran los sensogramas de Proteon (Biacore) obtenidos para la unión de las variantes del anticuerpo CDR-H3 a la proteína quimérica portadora del antígeno CEA NABA. Se inmovilizó NABA biotinilada en un chip recubierto con neutravidina y se usaron anticuerpos como analitos a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 nM, El clon precursor con afinidad madurada 5HFF12 y el anticuerpo original CH7A se incluyeron para una comparación directa. Todos los anticuerpos sometidos a prueba en este ensayo tenían 2F1 como cadena ligera. La variante de CH7A (W95Y) no muestra actividad mensurable en este ensayo, mientras que todas las demás variantes presentan una afinidad por la diana dentro de un factor de diez entre sí. La afinidad relativa de cada una, medida en la forma bivalente, es la siguiente: 5HFF12 > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (Y98A) > CH7A > CH7A (E102Q) > CH7A (D99Y) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (V101F) > CH7A (W95Y).

El análisis de DLS se realizó en los anticuerpos en comparación con su precursor 5HFF12 y el anticuerpo original que albergaba CH7A de cadena pesada. La cadena ligera 2F1 era idéntica para todos los anticuerpos sometidos a prueba en este experimento (figuras 23 y 24). Los resultados de este análisis proporcionaron la siguiente clasificación en estabildades: CH7A (D99Y) > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (V101F) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (W95Y) > CH7Ax2F1 (= PR1A3) > 5HFF12. El ensayo de DLS se realizó usando 1 mg/ml de los anticuerpos en un tampón de histidina 20 mM y NaCl 140 mM a pH 6,0. El ensayo se realizó empezando en 25 °C, con un aumento de temperatura incremental de 0,05 °C/min hasta 70 °C.

El doble mutante (Y98A/D99Y) (SEQ ID NO: 223) se eligió para la modificación adicional por ingeniería de la estabilidad, ya que presentaba una alta estabilidad mientras conservaba una alta afinidad por la diana de CEA.

Ejemplo 5

El doble mutante (Y98A/D99Y) del derivado de PR1A3 humanizado CH7A se introdujo en las variantes finales de la humanización basada en VH1, construcciones CH1A1A y CH1A1B.

Se obtuvieron los sensogramas de Proteon (Biacore) para la unión de la estructura combinada y las variantes de CDR-H3 a la proteína quimérica portadora del antígeno CEA NABA. Se inmovilizó NABA biotinilada en un chip recubierto con neutravidina y se usaron anticuerpos como analitos a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 nM, El clon precursor 5L1A10 y el anticuerpo original CH7A se incluyeron para una comparación directa. Todos los anticuerpos sometidos a prueba en este ensayo tenían 2F1 como cadena ligera (figura 25).

Ejemplo 6

Las construcciones CH1A1A y CH1A1B presentaron actividad de ADCC. La ADCC mediada por las variantes CH1A1A y CH1A1B, su variante precursora CH1A1 y la variante CH7A original se midió después de 4 h mediante liberación de lactato-deshidrogenasa utilizando células MKN45 como células diana (T) y PBMC humanas como células efectoras (E) en proporciones E:T de 25:1. La liberación de lactato-deshidrogenasa es proporcional a la lisis de células diana y se muestra como porcentaje de citotoxicidad (figura 26). La actividad de ADCC para estas variantes se confirmó

mediante medición por la liberación de calceína usando células MKN45 como células diana (T) y PBMC humanas como células efectoras (E) en proporciones E:T de 25:1. La liberación de calceína es proporcional a la lisis de células diana y se muestra como porcentaje de citotoxicidad con valores de medias \pm desviación estándar (figura 27).

5 También se observó actividad de ADCC para construcciones CH1A1A y CH1A1B que contienen la CDRH3 con afinidad madurada con la doble mutación Y98A/D99Y. La ADCC mediada por la estructura combinada y las variantes CDR-H3 y el anticuerpo original que alberga CH7A se midió después de 24 h mediante liberación de lactato-deshidrogenasa usando células MKN45 (figura 28) o LS174T (figura 29) como células diana y PBMC humanas como células efectoras en proporciones E:T de 5:1. Mientras que las células MKN45 expresan el CEA en niveles altos, la expresión de CEA es intermedia en células LS174T. La liberación de lactato-deshidrogenasa es proporcional a la lisis de células diana y se muestra como porcentaje de citotoxicidad. Todos los anticuerpos sometidos a prueba en estos ensayos de ADCC tenían 2F1 como cadena ligera

15 La figura 38 muestra las alineaciones de secuencia de aminoácidos de las regiones VH de diversos anticuerpos anti-CEA de estabilidad madurada.

Ejemplo 7

20 La versión obtenida por glicoingeniería del anticuerpo anti-CEA que comprende la cadena pesada CF1A1A (98/99) y la cadena ligera 2F1 se sometió a prueba para determinar su eficacia en un modelo de xenoinjerto de carcinoma colorrectal en ratones SCID transgénicos para CD16 humana. Las condiciones del ensayo modelo se exponen a continuación. Los resultados del ensayo indican que este anticuerpo anti-CEA proporciona un beneficio para la supervivencia en comparación con un vehículo de control (figura 30).

25 **Animales:** Ratones hembra transgénicos SCID CD16 de 7-9 semanas de edad en el momento del inicio del experimento (Charles River France) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz y 12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y aprobado por las autoridades gubernamentales locales. Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para su aclimatación y observación. La monitorización continua de la salud se llevó a cabo de manera regular.

30 **Cultivo celular y aplicación:** Se cultivaron células LS174T (células de carcinoma de colon humano, European Collection of Cell Culture) en medio DMEM que contenía FCS al 10 % (PAA Laboratories, Austria). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %. El pase 24 *in vitro* se usó para inyección intraesplénica, con una viabilidad del 97 %.

35 **Inyección de células tumorales:** El día de la inyección, las células tumorales LS174T se recogieron usando tripsina-EDTA (Gibco, Suiza) de matraces de cultivo (Greiner Bio-One) y se transfirieron a 50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se resuspendieron en AIM V (Gibco, Suiza). Se realizó una pequeña incisión en el sitio abdominal izquierdo del ratón SCID/beige anestesiado. La piel y el músculo se abrieron y se inyectaron treinta microlitros (3×10^6 células LS174T en medio AIM V) de suspensión celular en el vértice del bazo. El músculo primero y la piel abdominal después se suturaron con suturas absorbibles (Monosyn® 3-0, Braun).

40 **Tratamiento:** Todos los anticuerpos anti-CEA y el vehículo correspondiente se administraron i.v. una vez a la semana. Tres dosis en total. Se administraron 625 μ g de anticuerpo por inyección por ratón. Las diluciones de anticuerpo se prepararon frescas a partir de la solución madre antes del uso y se formularon en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 a una concentración de anticuerpo de 4,38 mg/ml.

Ejemplo 8

50 La versión obtenida por glicoingeniería del anticuerpo anti-CEA que comprende la cadena pesada CH1A1A (Y98A/D99Y) y la cadena ligera 2F1 se sometió a prueba para determinar su eficacia en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón A549 en ratones SCID transgénicos para CD16 humana. Las condiciones del ensayo modelo se exponen a continuación. Los resultados del ensayo indican que este anticuerpo anti-CEA proporciona un beneficio para la supervivencia dependiente de la dosis en comparación con un vehículo de control (figura 31).

55 **Animales:** Treinta y cinco ratones hembra transgénicos SCID CD16 de 7-9 semanas de edad en el momento del inicio del experimento (Charles River France) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz y 12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y aprobado por las autoridades gubernamentales locales. Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para su aclimatación y observación. La monitorización continua de la salud se llevó a cabo de manera regular.

60 **Cultivo celular y aplicación:** Se cultivaron células A549 (células de CPNM humanas, colección de American Tissue Culture) en medio DMEM que contenía FCS al 10 % (PAA Laboratories, Austria). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5 %.

Tratamiento: El día 0 de estudio se inyectaron i.v. a los ratones 1×10^6 células A549. El anticuerpo comenzó el día 7 del estudio y continuó con 2 inyecciones semanales más.

5 Grupos de tratamiento:

Ratones: 35 ratones SCID-CD16Tg, $N = 7$ por grupo.

Células: células A549 5 Mio/ratón

Compuesto y programación del tratamiento

10 Vehículo 3q7d

CH1A1A(Y98A/D99Y) \times 2F1 (500 ug) 3c7d (25 mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) \times 2F1 (200 ug) 3c7d (10 mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) \times 2F1 (100 ug) 3c7d (5 mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) \times 2F1 (50 ug) 3c7d (1 mg/kg)

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG
 5 <120> ANTICUERPOS CONTRA CEA
 <130> 27344
 <150> EP 11156665.9
 10 <151> 2011-03-02
 <160> 281
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Kabat
 <400> 1
 30 **Glu Phe Gly Met Asn**
1 5
 <210> 2
 35 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Kabat
 45 <400> 2
Glu Tyr Gly Met Asn
1 5
 <210> 3
 50 <211> 5
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada Kabat
 60 <400> 3

Glu Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 4

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Región variable de cadena pesada

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

20 <223> Xaa = Tyr o Phe

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa = Ser o Gly

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (35)..(35)

<223> Xaa = Asn o Ser

<220>

40 <221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(50)

45 <223> Xaa = Trp o Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

50 <222> (55)..(55)

<223> Xaa = Thr, Ser o Asn

55 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)

60 <223> Xaa = Thr o Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
5 <223> Xaa = Val o Met
<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <222> (101)..(101)
<223> Xaa = Phe o Ala
15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (102)..(102)
20 <223> Xaa = Val, Phe, Ser, Tyr o Ala
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103)..(103)
<223> Xaa = Asp, His, Trp, Glu o Tyr
30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
35 <223> Xaa = Val, Phe o Leu
<220>
40 <221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
45 <223> Xaa = Glu, Lys o Gln
<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (107)..(107)
<223> Xaa = Ala o Thr
55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (108)..(108)
60 <223> Xaa = Met o Leu
<400> 4

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Xaa Ile Asn Thr Lys Xaa Gly Glu Ala Xaa Tyr Xaa Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

15

<400> 5

Glu Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 6

20

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

30

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
1 5

<210> 7

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CDR1 de cadena pesada Chothia

15 <400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
1 5

<210> 8

20 <211> 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada AbM

30 <400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Gly Met Asn
1 5 10

35 <210> 9

<211> 10

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada AbM

45 <400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gly Met Asn
1 5 10

50 <210> 10

<211> 10

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> CDR1 de cadena pesada AbM
 <400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ser Met Asn
 5 **1** **5** **10**
 <210> 11
 <211> 108
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 25 <223> Xaa = Gln, Ala, Lys o His
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa = Asn, Ala, Tyr, Ile, Lys o Thr
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 40 <223> Xaa = Val, Ala, Gly o Met
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa = Gly, Ser, Thr o Leu
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = Thr, Asn, Pro o Ala
 <220>
 60 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)

<223> Xaa = Asn o Tyr
<220>
5 <221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(46)
<223> Xaa = Pro o Leu
10 <220>
<221> MISC_FEATURE
15 <222> (50)..(50)
<223> Xaa = Ser, Leu o Trp
<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(53)
25 <223> Xaa = Tyr, Asn o His
<220>
<221> MISC_FEATURE
30 <222> (54)..(54)
<223> Xaa = Arg, Leu, Pro o His
35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(55)
40 <223> Xaa = Tyr, Ser, Gln, Lys, Phe, Pro o Glu
<220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> Xaa = Ser, Gly, Ile o Arg
50 <400> 11

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

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

Tyr Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 12

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada AbM

15

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 13

20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada Kabat

30

<400> 13

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 14

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CDR2 de cadena pesada Kabat

15 <400> 14

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 15

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada Kabat

30 <400> 15

Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 16

35 <211> 17

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CDR2 de cadena pesada Kabat

<400> 16

<211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada Chothia
 10 <400> 20

Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn
1 5
 15 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> CDR2 de cadena pesada AbM
 <400> 21

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr
1 5 10
 30 <210> 22
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> CDR2 de cadena pesada AbM
 <400> 22

Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr
1 5 10
 45 <210> 23
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada AbM
 <400> 23
 60

Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn
1 5 10

<210> 24

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CDR2 de cadena pesada AbM

15 <400> 24

Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr
1 5 10

<210> 25

20 <211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada

30 <400> 25

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 26

<211> 12

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CDR3 de cadena pesada

<400> 26

Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

50 <210> 27

<211> 12

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 31
Trp Asp Phe Phe Tyr Tyr Val Gln Thr Met Asp Tyr
 10 **1 5 10**
 <210> 32
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 32
 25 **Trp Asp Phe Ser Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr**
1 5 10
 <210> 33
 30 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 40 <400> 33
Trp Asp Phe Ala His Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr
1 5 10
 <210> 34
 45 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 55 <400> 34
Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 35
Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Leu Glu Ala Met Asp Tyr
 15 **1 5 10**
 <210> 36
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> CDR1 de cadena ligera
 <400> 36
 30 **Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala**
1 5 10
 <210> 37
 35 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 45 <400> 37
Lys Ala Ser Ala Asn Val Gly Asn Asn Val Ala
1 5 10
 <210> 38
 50 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 60

<400> 38

Lys Ala Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

5 <210> 39

<211> 11

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 39

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1 5 10

20

<210> 40

<211> 11

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Tyr Ala Ser Thr Asn Val Ala
1 5 10

35

<210> 41

<211> 11

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 41

50

Lys Ala Ser His Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 42

55

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> CDR1 de cadena ligera

<400> 42

Lys Ala Ser Gln Ile Met Gly Pro Asn Val Ala
1 5 10

10

<210> 43

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 43

Lys Ala Ser Gln Ile Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

25

<210> 44

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> CDR1 de cadena ligera

<400> 44

40

Lys Ala Ser Gln Lys Val Leu Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 45

45

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> CDR1 de cadena ligera

55

<400> 45

Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn Val Ala
1 5 10

<210> 46

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CDR2 de cadena ligera

<400> 46

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

15 <210> 47

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 47

30 **Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ser Gly**
1 5

<210> 48

35 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> CDR2 de cadena ligera

45 <400> 48

Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Gln Ile
1 5

<210> 49

50 <211> 8

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera

60

<400> 49

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

5 <210> 50

<211> 8

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 50

Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

20

<210> 51

<211> 8

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 51

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser
1 5

35

<210> 52

<211> 8

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 52

50

Tyr Leu Ala Ser Tyr His Glu Ser
1 5

<210> 53

55

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> CDR2 de cadena ligera

<400> 53

Tyr Ser Ala Ser His Arg Pro Ser
1 5

10

<210> 54

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 54

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

25

<210> 55

<211> 8

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> CDR2 de cadena ligera

<400> 55

40

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg
1 5

<210> 56

45 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera

55 <400> 56

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 57
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> CDR1 de cadena pesada
 <400> 57
 15 **ggatacacct tcactgagtt tggaatgaac** 30
 <210> 58
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> CDR1 de cadena pesada
 <400> 58
 30 **ggatacacct tcactgagta tggtatgaac** 30
 <210> 59
 35 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada
 45 <400> 59
ggatacacct tcactgagta ttctatgaac 30
 <210> 60
 50 <400> 60
 000
 55 <210> 61
 <211> 30
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> CDR1 de cadena pesada

	<400> 61	
	ggatacacct tcactgagtt tggaatgagc	30
5	<210> 62	
	<211> 51	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> CDR2 de cadena pesada	
	<400> 62	
20	tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatgttgaag agttaaggg a	51
	<210> 63	
	<211> 51	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> CDR2 de cadena pesada	
	<400> 63	
35	tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatattgaag agttaaggg a	51
	<210> 64	
40	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> CDR2 de cadena pesada	
50	<400> 64	
	tggataaaca ccaaaagtgg agaggcaaca tatgttgaag agttaaggg a	51
	<210> 65	
55	<211> 51	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 657 856 T3

<223> CDR2 de cadena pesada
<400> 65
5 **tatataaaca ccaaaaatgg agaggcaaac tatgttgaag agttaaaggg a** 51
<210> 66
<211> 51
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> CDR2 de cadena pesada
<400> 66
20 **tggataaaca ccaaaaatgg agaggcaaca tatattgaag agttaaaggg a** 51
<210> 67
25 <211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> CDR3 de cadena pesada
35 <400> 67
tgggacttct atgattacgt ggaggctatg gactac 36
<210> 68
40 <211> 36
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
220>
<223> CDR3 de cadena pesada
50 <400> 68
tgggacttct atcattacgt ggaggctatg gactac 36
55 <210> 69
<211> 36
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial
<220>

<223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 69

5 **tgggacttcg tggattacgt ggaggctatg gactac** 36

<210> 70
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 70

20 **tgggacttct attggtacgt ggaggctatg gactac** 36

<210> 71
 25 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 71

35 **tgggacgcct ttgagtacgt gaaggcgctg gactac** 36

<210> 72
 40 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 72

50 **tgggatttct ttgagtattt taagactatg gactac** 36

<210> 73
 <211> 36
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 73

5 **tgggactttt tttattacgt gcagactatg gactac** 36

<210> 74
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 74

20 **tgggattttt cttattacgt tgaggcgatg gactac** 36

<210> 75
 25 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 75

35 **tgggactttg ctcattactt tcagactatg gactac** 36

<210> 76
 40 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 76

50 **tgggacttcg cttattactt tcagactatg gactac** 36

55 <210> 77
 <211> 36
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> CDR3 de cadena pesada
 <400> 77
 5 **tgaggatttcg cgtattacct tgaggctatg gactac** 36
 <210> 78
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 <400> 78
 20 **aaggccagtc agaatgtggg tactaatggt gcc** 33
 <210> 79
 25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 <400> 79
 35 **aaggccagtg ccaatgtggg taataatggt gcc** 33
 <210> 80
 40 <211> 33
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 50 <400> 80
aaggccagta agaatgtggg gactaatggt gcg 33
 55 <210> 81
 <211> 33
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> CDR1 de cadena ligera

<400> 81
aaggccagtg cggctgtggg tacgtatggt gcg 33
 5
 <210> 82
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> CDR1 de cadena ligera
 <400> 82
 20 **aaggccagtc agatagcggag tactaatggt gcc** 33
 <210> 83
 <211> 33
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 <400> 83
 35 **aaggccagtc acaatgtggg taccaacgtt gcg** 33
 <210> 84
 40 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 50 <400> 84
aaggccagtc agattatggg tcctaatggt gcg 33
 <210> 85
 55 <211> 33
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera
 65

	<400> 85	
	aaggccagtc aaattgtggg tactaatggt gcg	33
5	<210> 86	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> CDR1 de cadena ligera	
	<400> 86	
	aaggccagtc agaaggtgct tactaatggt gcg	33
20	<210> 87	
	<211> 33	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> CDR1 de cadena ligera	
	<400> 87	
35	aaggccagtc agactgtgag tgctaatggt gcg	33
	<210> 88	
	<211> 24	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> CDR2 de cadena ligera	
	<400> 88	
50	tattcggcat cctaccgcta cagt	24
	<210> 89	
55	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> CDR2 de cadena ligera	

<400> 89
tatttggcct ccaacctctc cggt **24**

5 <210> 90
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>

15 <223> CDR2 de cadena ligera
 <400> 90
tacctggcat cctaccccca gatt **24**

20 <210> 91
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> CDR2 de cadena ligera
 <400> 91
tattcggcat cctaccgcaa aagg **24**

35 <210> 92
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

45 <223> CDR2 de cadena ligera
 <400> 92
 50 **tattgggcat cctaccgcta tagt** **24**

<210> 93
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera

	<400> 93	
5	tattcggcat cccaccggta cagt	24
	<210> 94	
	<211> 24	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> CDR2 de cadena ligera	
	<400> 94	
20	tatttggcat cctaccacga aagt	24
	<210> 95	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> CDR2 de cadena ligera	
	<400> 95	
35	tattcggcat cccaccgtcc cagt	24
	<210> 96	
40	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> CDR2 de cadena ligera	
50	<400> 96	
	tatttggcat cctaccgcta cagt	24
	<210> 97	
55	<211> 24	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CDR2 de cadena ligera	

ES 2 657 856 T3

<400> 97
5 **tatttggcat cctaccgcta caga** 24
<210> 98
<211> 30
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> CDR3 de cadena ligera
<400> 98
20 **caccaatatt acacctatcc tctattcag** 30
<210> 99
<211> 121
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> PR1A3 VH
<400> 99
35
Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

ES 2 657 856 T3

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Lys Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 100

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pEM1496 huPR1A3 VH

15

<400> 100

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 101
- 5 <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH7A
- 15 <400> 101

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 102

5 <211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> IGHV7-4-1*02

15 <400> 102

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

ES 2 657 856 T3

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 103

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> PR1A3 VL

15 <400> 103

ES 2 657 856 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 104

5 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pEM1495 huPR1A3 VL

15

<400> 104

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 105

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CL1A

15 <400> 105

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 657 856 T3

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 106

5 <211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IMGT_hVK_1_39

15 <400> 106

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
85 90 95

<210> 107

20

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> CH7 rF9

30

<400> 107

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 108
- <211> 110
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CLA1 rH11
- 15 <400> 108

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn
 20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 109

5 <400> 109

000

<210> 110

10

<400> 110

000

15 <210> 111

<211> 363

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> PR1A3 VH

<400> 111

ES 2 657 856 T3

caggtgaagc tgcagcagtc aggacctgag ttgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg cttctggata taccttcaca gaattcggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
 cctggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgccttc tctttggaga cctctgccac cactgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctaaat atttctgtgc tcgatgggat 300
 ttctatgact atgttgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360
 tca 363

<210> 112

5 <211> 362

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pEM1496

15 <400> 112

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagttggaat gaactgggtg cgacaggccc 120
 ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga taaacaccaa aactggagag gcaacatatg 180
 ttgaagagtt taagggacgg tttgtcttct ccttggacac ctctgtcagc acggcatatc 240
 tgcagatcag cagcctaaag gctgacgaca ctgccgtgta ttactgtgcg agatgggact 300
 tctatgatta cgtggaggct atggactact gggggccaag gaccacggtc accgtctcct 360
 ca 362

<210> 113

20 <211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH7A

30 <400> 113

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 114

5 <211> 294

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IGHV7-4-1*02

15 <400> 114

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttact agctatgcta tgaattgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacca aactgggaa cccaacgtat 180
 gcccagggct tcacaggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gaga 294

<210> 115

20 <211> 330

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PR1A3 VL

30 <400> 115

ES 2 657 856 T3

gatatcgtga tgacccagtc tcaaagattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatggtg cctggtatca acagaaacca 120
 ggacaatccc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtacagtct 240
 gaagacttgg cggagtattt ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgttcggc 300
 tcggggacaa agttggaaat gaaacgtacg 330

<210> 116

5 <211> 327

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pEM1495

15 <400> 116

gacatccaga tgactcagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60
 atcacctgta aggccagtca gaatgtgggt actaatggtg cctggtacca gcagaagcca 120
 ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcctacc ggtacagtgg tgtgccaaagc 180
 agattcagcg gtagcggtag cggtagccgac ttcaccttca ccatcagcag cctccagcca 240
 gaggacatcg ccacctacta ctgccaccaa tattacacct atcctctatt cagcttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacgt 327

<210> 117

20

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> CL1A

30

<400> 117

ES 2 657 856 T3

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caag 324

<210> 118

5 <211> 285

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IMGT_hVK_1_3 9

15 <400> 118

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccct 285

<210> 119

20

<211> 369

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> CH7 rF9

30

<400> 119

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagctagc 369

<210> 120

5 <211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CLA1 rH11

15

<400> 120

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gactgtgagt gctaagtgtg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcacacctacc gctacagagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 121

20

<211> 987

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgG1

30

<400> 121

accaagggcc catcggctct cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 60
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 120
 tcaggegcce tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 180
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 240

ES 2 657 856 T3

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagcaga gcccaaactct	300
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	360
gttttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	420
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	480
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	540
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	600
aagtgcaagg tctccaacia agccctcca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	660
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	720
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	780
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	840
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	900
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	960
agcctctccc tgtctccggg taaatga	987

<210> 122

5 <211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> IgG1

15

<400> 122

ES 2 657 856 T3

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 1 5 10 15

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 35 40 45

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala
 85 90 95

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador MS-43	
10	<400> 123	
	ccagccggcc atggccgata tccagatgac ccagtctcca tc	42
15	<210> 124	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador MS-52	
25	<400> 124	
	gaagaccgat gggcctttgg tgctag	26
30	<210> 125	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador MS-55	
	<400> 125	
	gcaacatag ttgaagagtt taagggacgg	30
45	<210> 126	
	<211> 25	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> MS-56	
	<400> 126	
60	atgaactggg tgcgacaggc ccctg	25
	<210> 127	
	<211> 56	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador EAB-679
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26) . . (26)
 15 <223> m e s a o c
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (27) . . (28)
 <223> n e s a , c , g o t
 25 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (30) . . (30)
 <223> w e s a o t
 <400> 127
 35 **caggggcctg tgcacccag ttcattmnnaw actcagtgaa ggtgtatcca gaagcc** 56
 <210> 128
 40 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador EAB-680
 50 <400> 128
ccgtccctta aactcttcaa catagggtgc ctctccagtt ttggtgttta tccatcccat 60
ccactcaagc ccttgtccag g 81
 <210> 129
 55 <211> 50
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>

	<223> Cebador EAB-685	
	<400> 129	
5	cagctatgac catgattacg ccaagcttgc atgcaaattc tatttcaagg	50
	<210> 130	
	<211> 27	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador EAB-686	
	<400> 130	
20	gttgcgtggt atcagcagaa accaggg	27
	<210> 131	
25	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador EAB-687	
35	<400> 131	
	gctctttgtg acgggcgagc tcaggccctg atgg	34
	<210> 132	
40	<211> 35	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EAB-688	
50	<400> 132	
	ggagtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgg	35
55	<210> 133	
	<211> 70	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador EAB-681	

ES 2 657 856 T3

<400> 133
cctggtttct gctgatacca cgcaacatta gtaccocat tctgactggc cttgcaagtg 60
atggtgactc 70

5
 <210> 134
 <211> 77

10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

15
 <223> Cebador EAB-682
 <400> 134
ctgccactga accttgatgg gactccactg tagcggtagg atgccgaata gatcaggagc 60
ttaggtgctt tccctgg 77

20
 <210> 135
 <211> 64

25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Cebador AC7
 <220>

35
 <221> misc_feature
 <222> (37) . . (37)

40
 <223> m e s a o c
 <220>
 <221> misc_feature

45
 <222> (38) . . (39)
 <223> n e s a , c , g o t

50
 <400> 135
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaagtcmmnt ctcgcacagt aatacacggc 60
agtg 64

55
 <210> 136
 <211> 64
 <212> ADN

ES 2 657 856 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador AC8
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (34) . . (34)
 <223> m e s a o c
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35) . . (36)
 20 <223> n e s a , c , g o t
 <400> 136
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaamnccat ctcgcacagt aatacacggc 60
 25 **agtg 64**
 <210> 137
 <211> 64
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador AC9
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (31) . . (31)
 45 <223> m e s a o c
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (32) . . (33)
 <223> n e s a , c , g o t
 55 <400> 137
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata mnngtcccat ctcgcacagt aatacacggc 60
agtg 64
 <210> 138
 60 <211> 64

<212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador AC10
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28) . . (28)
 15 <223> m e s a o c
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (29) . . (30)
 <223> n e s a , c , g o t
 25 <400> 138

ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcmnn gaagtcccat ctcgcacagt aatacacggc 60
agtg 64
 30 <210> 139
 <211> 64
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador AC11
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (25) . . (25)
 <223> m e s a o c
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26) . . (27)
 55 <223> n e s a , c , g o t
 <400> 139

ccagtagtcc atagcctcca cgtamnata gaagtcccat ctcgcacagt aatacacggc 60
agtg 64
 60

ES 2 657 856 T3

<210> 140
<211> 64
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Cebador AC12
<220>
15 <221> misc_feature
<222> (37) . . (37)
<223> m e s a o c
20 <220>
<221> misc_feature
25 <222> (38) . . (39)
<223> n e s a , c , g o t
<400> 140
30 **cgtgggtcct tggccccagt agtccatagc ctccacmna tcatagaagt cccatctcgc 60**
acag 64
<210> 141
35 <211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Cebador AC13
45 <220>
<221> misc_feature
<222> (34) . . (34)
50 <223> m e s a o c
<220>
55 <221> misc_feature
<222> (35) . . (36)
<223> n e s a , c , g o t
60 <400> 141

ES 2 657 856 T3

	cgtgggtccct tggccccagt agtccatagc ctcmmngtaa tcatagaagt cccatctcgc	60
	acag	64
	<210> 142	
5	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador AC14	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (31) . . (31)	
20	<223> m es a o c	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (32).. (33)	
	<223> n es a, c, g o t	
30	<400> 142	
	cgtgggtccct tggccccagt agtccatagc mnncacgtaa tcatagaagt cccatctcgc	60
	acag	64
35	<210> 143	
	<211> 64	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador AC15	
	<220>	
	<221> misc_feature	
50	<222> (28) . . (28)	
	<223> m es a o c	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (29) . . (30)	
60	<223> n es a, c, g o t	

<400> 143

cgtggtcct tggccccagt agtccatmnn ctccaogtaa tcatagaagt cccatctcgc 60

acag 64

5 <210> 144

<211> 64

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador AC16

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (25) . . (25)

<223> m es a o c

25 <220>

<221> misc_feature

30 <222> (26)..(27)

<223> n es a, c, g o t

<400> 144

35 **cgtggtcct tggccccagt agtcmnnagc ctccaogtaa tcatagaagt cccatctcgc** 60

acag 64

<210> 145

40 <211> 77

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Cebador AC17

50 <400> 145

cgtggtcct tggccccagt agtccatagc ctccaogtaa tcatagaagt cccatctcgc 60

acagtaatac acggcag 77

<210> 146

55 <211> 25

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador EAB-749	
	<400> 146	
10	ccatcagggc ctgagctcgc ccgtc	25
	<210> 147	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador EAB-750	
	<400> 147	
25	cgtggaggct atggactact ggggccaagg	30
	<210> 148	
30	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador EAB-751	
40	<400> 148	
	gactactggg gccaagggac cacggtcac	29
	<210> 149	
45	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EAB-752	
55	<400> 149	
	ggtcagggcg cctgagttcc acg	23
60	<210> 150	
	<211> 60	
	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador AC1
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (37) . . (37)
 <223> m e s a o c
 15 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (38) . . (39)
 <223> n e s a , c , g o t
 <400> 150
 25 **ggtagcctgg ccaaactga atagaggata ggtgtamnt tggtagacagt agtaagttgc** 60
 <210> 151
 30 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador AC2
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34) . . (34)
 45 <223> m e s a o c
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (35) . . (36)
 <223> n e s a , c , g o t
 55 <400> 151
ggtagcctgg ccaaactga atagaggata ggtmnnatat tggtagacagt agtaagttgc 60
 60 <210> 152
 <211> 60
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador AC3
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (31) . . (31)
 <223> m e s a o c
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32) . . (33)
 20 <223> n e s a , c , g o t
 <400> 152
 25 **gggtgccctgg ccaaactga atagaggata mnngtaatat tggtgacagt agtaagttgc** 60
 <210> 153
 <211> 60
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador AC4
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (28) . . (28)
 45 <223> m e s a o c
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (29) . . (30)
 <223> n e s a , c , g o t
 55 <400> 153
gggtgccctgg ccaaactga atagaggmnn ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc 60
 <210> 154
 60 <211> 60
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 657 856 T3

<220>
5 <223> Cebador AC5
<220>
<221> misc_feature
10 <222> (22) . . (22)
<223> m e s a o c
<220>
15 <221> misc_feature
<222> (23) . . (24)
20 <223> n e s a , c , g o t
<400> 154
25 **gggtgccctgg ccaaacgtga amnnaggata ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc** 60
<210> 155
<211> 60
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> Cebador AC6
<400> 155
40 **gggtgccctgg ccaaacgtga atagaggata ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc** 60
<210> 156
<211> 36
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> Cebador EAB-746
<400> 156
55 **cgcttgatct cgagcttggg gccctggcca aacgtg** 36
<210> 157
<400> 157
60 000
<210> 158

ES 2 657 856 T3

<211> 428

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pETR6592

10

<400> 158

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Met Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
195 200 205

15

ES 2 657 856 T3

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser
 210 215 220

Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn
 225 230 235 240

Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr
 245 250 255

Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr
 260 265 270

Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Leu Ser
 275 280 285

Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
 290 295 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly
 305 310 315 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
 325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
 340 345 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile
 355 360 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala
 370 375 380

Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln
 385 390 395 400

Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
 405 410 415

Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
 420 425

<210> 159

5

<211> 363

ES 2 657 856 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> PMS22

<400> 159

10 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcttgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 160

15 <211> 363

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 1C8

25 <400> 160

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcttgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatcatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

30 <210> 161

<211> 363

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> 3E1

<400> 161

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttcgtggatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

- 5 <210> 162
- <211> 363
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> 2D7
- 15 <400> 162

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctattggt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

- 20 <210> 163
- <211> 363
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Cadena pesada con afinidad madurada
- <400> 163

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 tttgctcatt actttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 164

5 <211> 363

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada con afinidad madurada

15 <400> 164

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttcgcttatt actttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 165

20 <211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada con afinidad madurada

30 <400> 165

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttctctc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 ttgcggtatt accttgaggc tatggactac tggggccaag ggaccacgat caccgctctc 360
 tca 363

<210> 166

5 <211> 363

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H3 completo (5) 19

15 <400> 166

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttctctc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 gcctttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgctctc 360
 tca 363

<210> 167

20 <211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H3 completo (5) 8

30 <400> 167

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 ttctttgagt attttaagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

5 <210> 168

<211> 363

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> H3 completo (5) 28

<400> 168

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 tttttttatt acgtgcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

20 <210> 169

<211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> H3 completo (5) 27

<400> 169

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 ttttcttatt acgttgaggc gatggactac tggggccaag ggaccacagt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 170

5 <211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cadena pesada de H4E9

15 <400> 170

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaatacca aaactggaga ggcaacttat 180
 attgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 171

20 <211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pAC14 (B9)

30 <400> 171

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggtt tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaagtggaga ggcaacctat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 172

5 <211> 363

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pAC15 (F9)

15 <400> 172

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 173

20 <211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 2

30 <400> 173

ES 2 657 856 T3

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtattcta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatac ataaacacca aaaatggaga ggcaactat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgctctcc 360
 tca 363

<210> 174

5 <211> 363

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 11

15 <400> 174

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaaatggaga ggcaacctat 180
 attgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgctctcc 360
 tca 363

<210> 175

20 <211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 13

30 <400> 175

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gaggttggta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat ataaacacca aaaatggaga ggcaactat 180

ES 2 657 856 T3

	gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggacg cctctgtcag cacggcatat	240
	ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac	300
	ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc	360
	tca	363
	<210> 176	
5	<211> 363	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> H1/H2 (5) 14	
15	<400> 176	
	caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
	tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat ataaacacca aaaatggaga ggcaactat	180
	gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat	240
	ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac	300
	ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc	360
	tca	363
	<210> 177	
20	<211> 363	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> H3 completo (5) 19	
30	<400> 177	

ES 2 657 856 T3

cagggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaag cttctggata caccttcaact gagtttgaa tgagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 gcctttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgctctcc 360
 tca 363

<210> 178

5 <211> 330

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pAC21 (3A1)

15 <400> 178

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtgc caatgtgggt aataatgttg cctgggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctatctg gcctccaacc gctccggtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 179

20 <211> 330

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pAC19 (2C6)

30 <400> 179

ES 2 657 856 T3

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtaa gaatgtgggg actaatggtg cgtgggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagccct gatctacctg gcatacctacc cccagattgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcccctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 180

5 <211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pAC18 (2F1)

15

<400> 180

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatggtg cgtgggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatacctacc gcaaaagggg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 181

20

<211> 330

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pAC23 (2F11)

30

<400> 181

ES 2 657 856 T3

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gatagcgagt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattgg gcacccctacc gctatagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 182

5 <211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena ligera de H4E9

15

<400> 182

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagcccct gatctattcg gcacccctacc gctacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 183

20

<211> 330

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> L2D2

30

<400> 183

ES 2 657 856 T3

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca caatgtgggt accaacgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcccacc ggtacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 184

5 <211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pAC6 (C1)

15

<400> 184

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gattatgggt cctaagtgtg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc acgaaagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 185

20

<211> 330

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pAC7 (E10)

30

<400> 185

ES 2 657 856 T3

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgca aggccagtca aattgtgggt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcccacc gtcccagtgg agtcccacatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 186

5 <211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pAC12 (H7)

15

<400> 186

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgca aggccagtca gaaggtgctt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc gctacagtgg agtcccacatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

<210> 187

20

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> pAC13 (H11)

30

<400> 187

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgca aggccagtca gactgtgagt gctaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcatcctacc gctacagagg agtcccacatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

ES 2 657 856 T3

<210> 188
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> PMS22
 <400> 188
 15
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 189
 20 <211> 121
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 1C8
 30 <400> 189

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 190

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> 3E1

15 <400> 190

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

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

ES 2 657 856 T3

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Val Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 191

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> 2D7

15 <400> 191

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Trp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 192

5

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada con afinidad madurada

15

<400> 192

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala His Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 193

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cadena pesada con afinidad madurada

15 <400> 193

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

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

ES 2 657 856 T3

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 194

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cadena pesada con afinidad madurada

15 <400> 194

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Leu Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 195
- <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> H3 completo (5) 19
- 15 <400> 195

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Ala Phe Glu Tyr Val Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 196

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> H3 completo (5) 8

15 <400> 196

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

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

ES 2 657 856 T3

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Phe Glu Tyr Phe Lys Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 197

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> H3 completo (5) 28

15 <400> 197

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

ES 2 657 856 T3

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 198

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> H3 completo (5) 27

15 <400> 198

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ser Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 199

20 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de H4E9

30 <400> 199

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 200
- 5 <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> pAC14 (B9)
- 15 <400> 200

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 201

5

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pAC15 (F9)

15

<400> 201

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 202

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> H1/H2 (5) 2

15

<400> 202

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

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

ES 2 657 856 T3

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

Gly Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 203

5 <211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 11

15 <400> 203

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 204

5

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 13

15

<400> 204

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Ala Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 205

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> H1/H2 (5) 14

15 <400> 205

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

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

ES 2 657 856 T3

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

Gly Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 206

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> H3 completo (5) 19

15 <400> 206

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Ala Phe Glu Tyr Val Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 207

<211> 110

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> pAC21 (3A1)

<400> 207

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Asn Val Gly Asn Asn
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ser Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 208

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> pAC19 (2C6)

15 <400> 208

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

ES 2 657 856 T3

Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Gln Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 209

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pAC18 (2F1)

15

<400> 209

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 210

20

<211> 110

ES 2 657 856 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> pAC23 (2F11)

<400> 210

10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ile Ala Ser Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 211

15 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cadena ligera de H4E9

25 <400> 211

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

- 5 <210> 212
- <211> 110
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> L2D2
- <400> 212

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser His Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 213

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pAC6 (C1)

15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ile Met Gly Pro Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 657 856 T3

35

40

45

Tyr Leu Ala Ser Tyr His Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 214

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pAC7 (E10)

15

<400> 214

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ile Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 215

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> pAC12 (H7)

15 <400> 215

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Lys Val Leu Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 216

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> pAC13 (H11)

15 <400> 216

ES 2 657 856 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn
 20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 217

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (Y98A)

15 <400> 217

Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 218

20

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (D99Y)

30

<400> 218

Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

- 5 <210> 219
- <211> 12
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (D99H)
- <400> 219

Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

- 20 <210> 220
- <211> 12
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (V101F)
- <400> 220

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

- 35 <210> 221
- <211> 12
- 40 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (E101aQ)
- <400> 221

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr
1 5 10

- 50 <210> 222
- <211> 12
- 55 <212> PRT

ES 2 657 856 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (A103T)

<400> 222

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 223

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (Y98A/D99Y)

<400> 223

25 **Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr**
1 5 10

<210> 224

<211> 12

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> CDR3 de cadena pesada de PR1A3 (W95Y)

<400> 224

Tyr Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 225

<211> 121

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH7A (Y98A) Construcción de cadena pesada

55 <400> 225

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 226

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CH7A (D99Y) Construcción de cadena pesada

15 <400> 226

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 227
- <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH7A (D99H) Construcción de cadena pesada
- 15 <400> 227

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 228

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH7A (V101F) Construcción de cadena pesada

15

<400> 228

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 229

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CH7A (E102Q) Construcción de cadena pesada

15 <400> 229

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 230
- 5 <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH7A (A103T) Construcción de cadena pesada
- 15 <400> 230

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 231

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH7A (Y98A/D99Y) Construcción de cadena pesada

15 <400> 231

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 232

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH7A (W95Y) Construcción de cadena pesada

15 <400> 232

ES 2 657 856 T3

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

- 5 <210> 233
- <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH1A1A (Y98A)
- 15 <400> 233

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 234

5 <211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (D99Y)

15 <400> 234

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 235

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1A (D99H)

15 <400> 235

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 236

5

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (V101F)

15

<400> 236

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>238

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

220>

<223> CH1A1A (A103T)

15

<400> 238

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 239
- <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH1A1A (Y98A/D99Y)
- 15 <400> 239

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 240

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1A (W95Y)

15 <400> 240

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 241

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CH1A1B (Y98A)

15 <400> 241

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 242
- <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH1A1B (D99Y)
- 15 <400> 242

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 243

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1B (D99H)

15 <400> 243

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 244

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CH1A1B (V101F)

15 <400> 244

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 245
- <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH1A1B (E102Q)
- 15 <400> 245

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 246

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1B (A103T)

15 <400> 246

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 247

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1B (Y98A/D99Y)

15 <400> 247

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 248

5

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1B (W95Y)

15

<400> 248

ES 2 657 856 T3

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

<210> 249

5 <211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CH7A (Y98A) Construcción de cadena pesada

15 <400> 249

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttcgctgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt cacctctccc 360
 tca 363

<210> 250

20 <211> 363

ES 2 657 856 T3

<212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CH7A (D99Y) Construcción de cadena pesada
 10 <400> 250
 caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctattatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363
 <210> 251
 15 <211> 363
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CH7A (D99H) Construcción de cadena pesada
 25 <400> 251
 caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatcatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363
 30 <210> 252
 <211> 364
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 657 856 T3

<223> CH7A (V101F) Construcción de cadena pesada

<400> 252

ccaggtgcag	ctggtgcaat	ctgggtctga	gttgaagaag	cctggggcct	cagtgaaggt	60
ttcctgcaag	gcttctggat	acaccttcac	tgagtttggga	atgaactggg	tgcgacaggc	120
ccctggacaa	gggcttgagt	ggatgggatg	gataaacacc	aaaactggag	aggcaacata	180
tgttgaagag	tttaagggac	ggtttgtctt	ctccttggac	acctctgtca	gcacggcata	240
tctgcagatc	agcagcctaa	aggctgaaga	cactgccgtg	tattactgtg	cgagatggga	300
cttctatgat	tacttgcagg	ctatggacta	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	360
5 ctca						364

<210> 253

<211> 364

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> CH7A (E102Q) Construcción de cadena pesada

<400> 253

20

ccaggtgcag	ctggtgcaat	ctgggtctga	gttgaagaag	cctggggcct	cagtgaaggt	60
ttcctgcaag	gcttctggat	acaccttcac	tgagtttggga	atgaactggg	tgcgacaggc	120
ccctggacaa	gggcttgagt	ggatgggatg	gataaacacc	aaaactggag	aggcaacata	180
tgttgaagag	tttaagggac	ggtttgtctt	ctccttggac	acctctgtca	gcacggcata	240
tctgcagatc	agcagcctaa	aggctgaaga	cactgccgtg	tattactgtg	cgagatggga	300
cttctatgat	tacgtgcagg	ctatggacta	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	360
ctca						364

<210> 254

25

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> CH7A (A103T) Construcción de cadena pesada

35

<400> 254

ES 2 657 856 T3

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 255

5

<211> 363

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH7A (Y98A/D99Y) Construcción de cadena pesada

15

<400> 255

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttcgcttatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

20 <210> 256

<211> 363

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> CH7A (W95Y) Construcción de cadena pesada

<400> 256

ES 2 657 856 T3

caggtgcagc tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatacgac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 257

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1

15 <400> 257

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 258
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> CH1A2
 <400> 258
 15
 Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 259
 20 <211> 121
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CH1A3
 30 <400> 259

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 260

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A4

15 <400> 260

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Lys Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 261

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1A

15

<400> 261

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 262
- <211> 121
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH1A1B
- 15 <400> 262

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 263

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> CH1A1C

15 <400> 263

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 264

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1D

15 <400> 264

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 267

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CH1A1G

15

<400> 267

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 268
- <211> 363
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH1A1
- 15 <400> 268

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt cgcacaggct 120
 ccaggccagg gcctogaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accctggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcbc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

ES 2 657 856 T3

<210> 269
 <211> 363
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> CH1A2
 <400> 269
 15 **caggtcaaac tgcagcagag cggccctgag ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc 60**
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggca 120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
agc 363
 <210> 270
 20 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> CH1A3
 <400> 270
 30 **caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg 60**
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt caagcaggcc 120
cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
agc 363
 <210> 271
 35 <211> 362
 <212> ADN

ES 2 657 856 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> CH1A4	
	<400> 271	
	aggtgcagct ggtgcagtct ggcgccgaag tgaagaaacc tggcgccagc gtgaaggtgt	60
	cctgcaaggc cagcggctac accttcaccg agttcggcat gaactgggtc cgacaggcac	120
	caggccaggg cctcgaatgg atgggctgga tcaacaccaa gaccggcgag gccacctacg	180
	tggaagagtt caagggcaga ttgccttca gcctggaaac cagcgccacc accgcctacc	240
	tgcagatcaa caacctgaag aacgaggata ccgccaagta cttctgcgcc agatgggact	300
	tctacgatta cgtggaagcc atggactact ggggccaggg caccaccgtg accgtgtcta	360
10	gc	362
	<210> 272	
	<211> 363	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> CH1A1A	
	<400> 272	
25	caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg	60
	tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct	120
	ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180
	gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac	240
	atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac	300
	ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360
	agc	363
	<210> 273	
30	<211> 363	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> CH1A1B	

ES 2 657 856 T3

<400> 273

caggtgaagc tgcagcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg	60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt cgcacaggct	120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac	240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcbc cagatgggac	300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360
agc	363

5 <210> 274

<211> 363

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CH1A1C

<400> 274

caggtgcagc tgggtgcagtc tggccccgaa ctgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg	60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt cgcacaggct	120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac	240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcbc cagatgggac	300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360
agc	363

20

<210> 275

<211> 363

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> CH1A1D

<400> 275

ES 2 657 856 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagagac tgtgaagatc 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcbc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 276

5 <211> 363

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1E

15 <400> 276

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag attcaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcbc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 277

20 <211> 363

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1F

30 <400> 277

ES 2 657 856 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccagggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 ctggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

- 5 <210> 278
- <211> 363
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CH1A1G
- 15 <400> 278

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccagggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaatcc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

- 20 <210> 279
- <211> 121
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> CH1A
- <400> 279

ES 2 657 856 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 280
 <211> 363
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CH1A

15 <400> 280

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctgggta cacatttacg gaattcggga tgaattgggt cagacaagca 120
 cctgggcaag ggctcgagtg gatgggatgg ataaacacga agacaggcga ggccacctac 180
 gtagaagagt tcaaaggaag ggtcacgatg accacagata cttctacctc tactgcgtat 240
 atggaactac ggagcttgcg tagcgatgac acagcgggtg actattgtgc tcgatgggat 300
 ttctatgact atgttgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360
 tca 363

ES 2 657 856 T3

<210> 281

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> PR1A3

<400> 281

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

15 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une al antígeno carcinoembrionario (CEA) unido a membrana, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende:
- 5 la CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 1,
la CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 13,
10 la CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 223;
y una región variable de cadena ligera que comprende:
15 la CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 39,
la CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 49, y
la CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 56.
- 20 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende los residuos estructurales de CH1A1A (SEQ ID NO: 261) o CH1A1B (SEQ ID NO: 262).
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3, o es capaz de competir por su unión con el mismo.
- 25 4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo se une al CEA unido a membrana con una K_d de 100 nM, 10 nM, 1 nM o menos.
5. Un anticuerpo que se une al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 239 y SEQ ID NO: 247 y en el que la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 209.
- 30 6. El anticuerpo según la reivindicación 5, en el que la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 239 y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 209.
- 35 7. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo comprende una región Fc que se ha modificado por glicoingeniería.
- 40 8. El anticuerpo según la reivindicación 7, en el que al menos de un 20 % a un 100 % de los oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos en la región Fc no son fucosilados.
- 45 9. El anticuerpo según la reivindicación 7, en el que al menos de un 20 % a un 100 % de los oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos en la región Fc son bisectados.
10. El anticuerpo según la reivindicación 7, en el que al menos de un 20 % a un 50% de los oligosacáridos unidos por enlaces *N*-glicosídicos en la región Fc son bisectados y no fucosilados.
- 50 11. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que el anticuerpo tiene al menos una función efectora aumentada.
12. El anticuerpo según la reivindicación 11, en el que al menos una función efectora aumentada se selecciona del grupo que consiste en: aumento de la afinidad de unión al receptor Fc, aumento de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, transducción de señales directa que induce apoptosis, aumento de la maduración de células dendríticas y aumento de la activación de linfocitos T.
- 55 13. El anticuerpo según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo tiene un aumento en la ADCC de al menos un 40 % a un 100 % en comparación con el anticuerpo original no modificado por glicoingeniería.
- 60 14. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
15. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 14.
- 65 16. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 15.

17. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 18. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o la composición de la reivindicación 17 para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa CEA de forma anormal.

10 19. El anticuerpo o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer gástrico, cáncer de páncreas y cáncer de mama.

20. El anticuerpo o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, en el que el anticuerpo o composición se administra en combinación con quimioterapia o radioterapia.

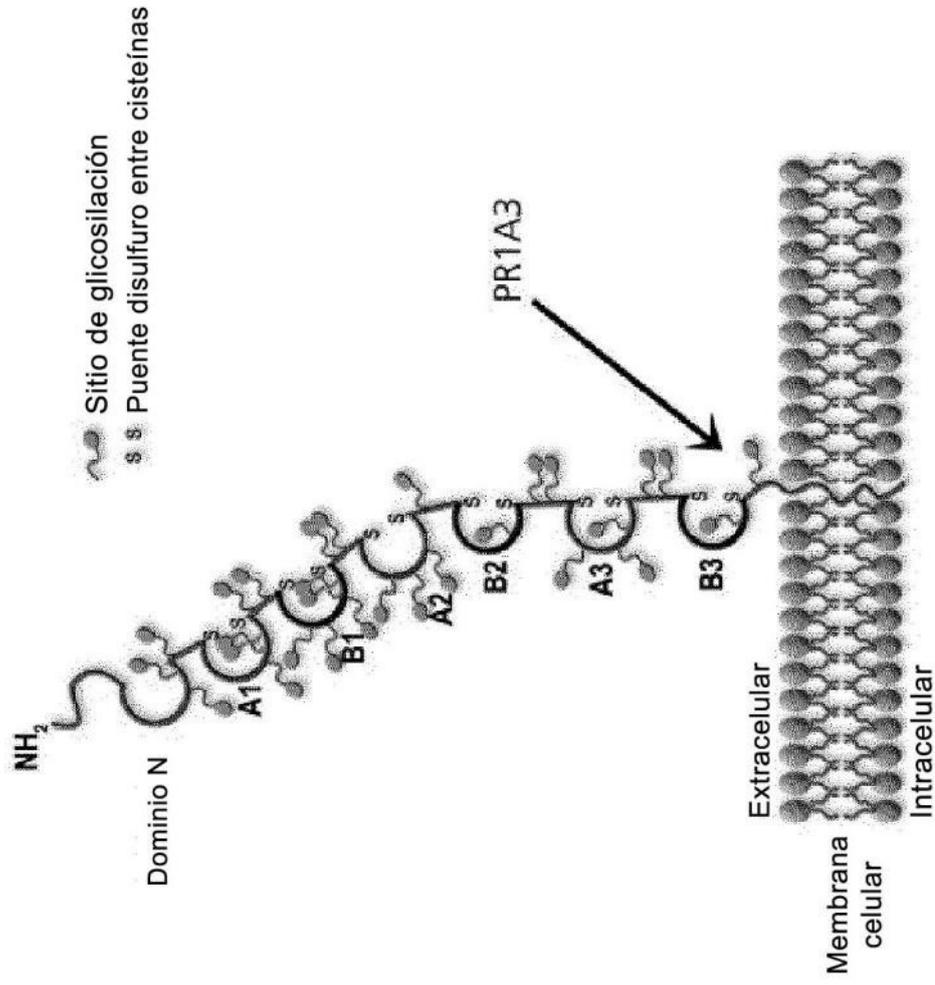


Fig. 1

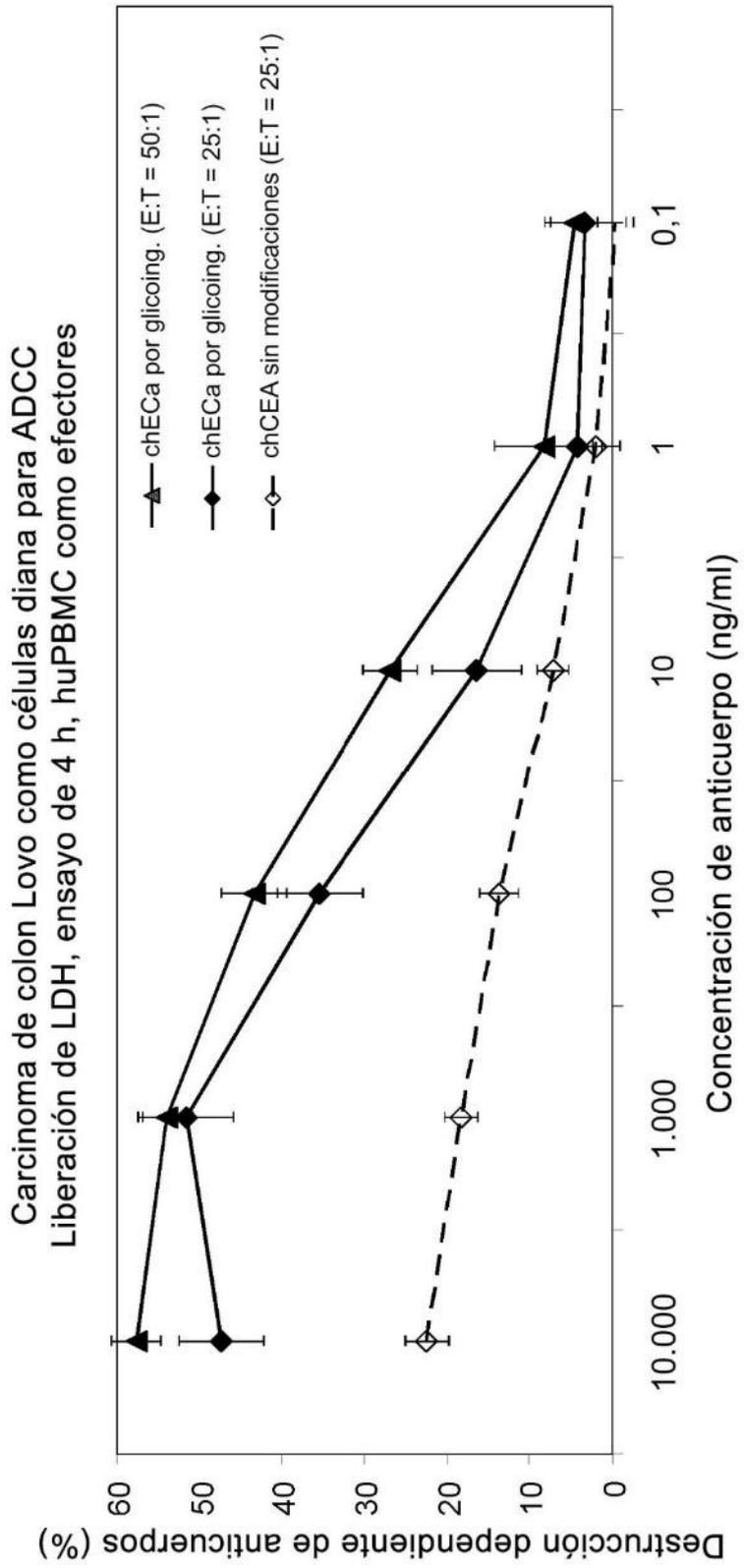


Fig. 2

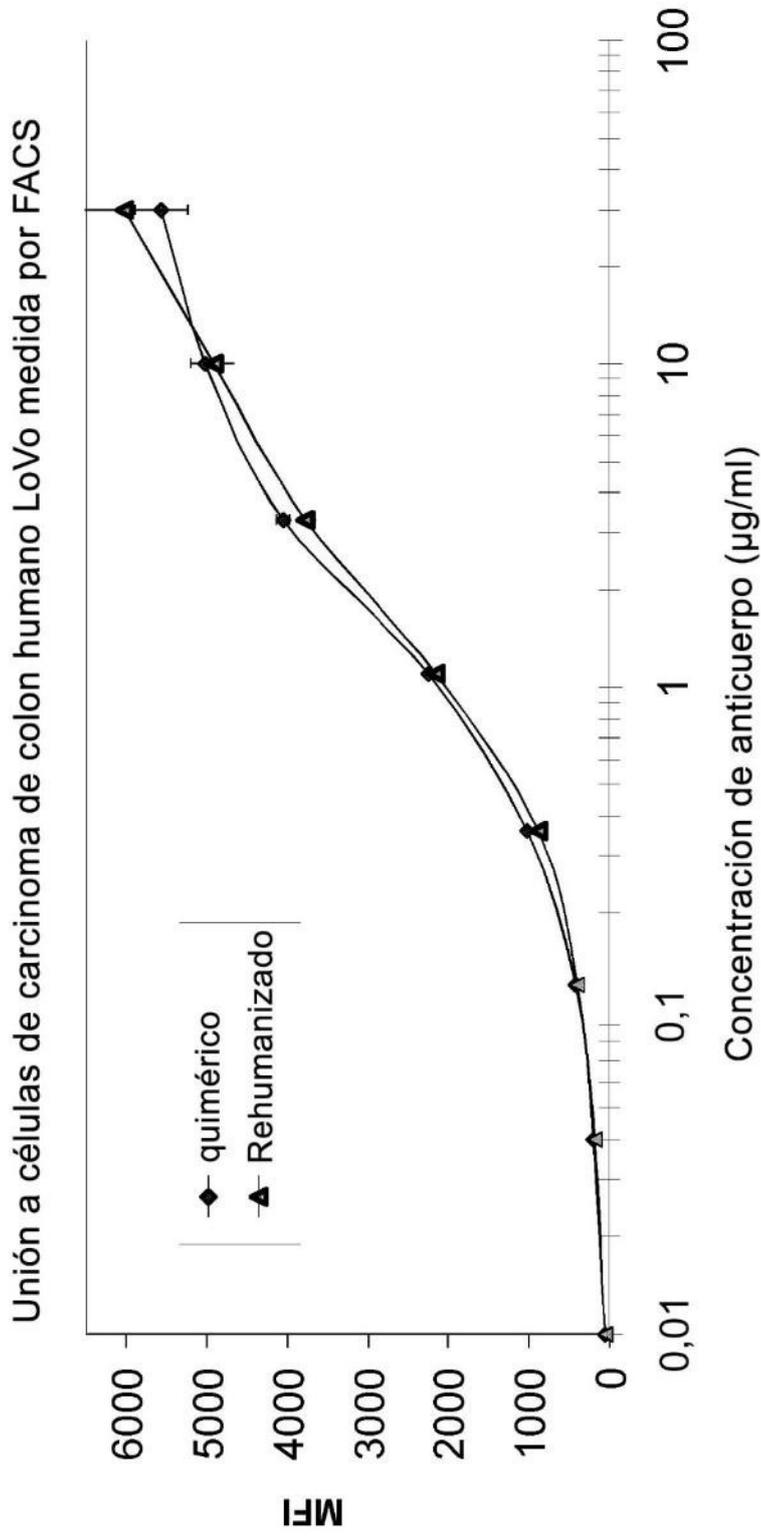


Fig. 3

VL'S

Kabat V
PR1A3-VL

Posiciones aleatorizadas

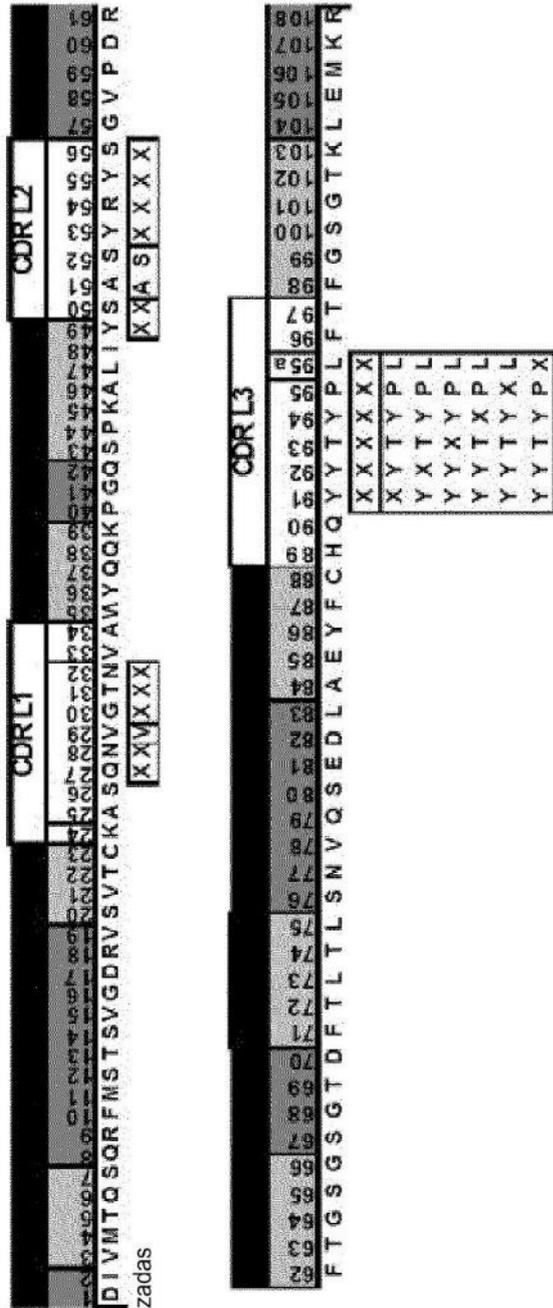


Fig. 4

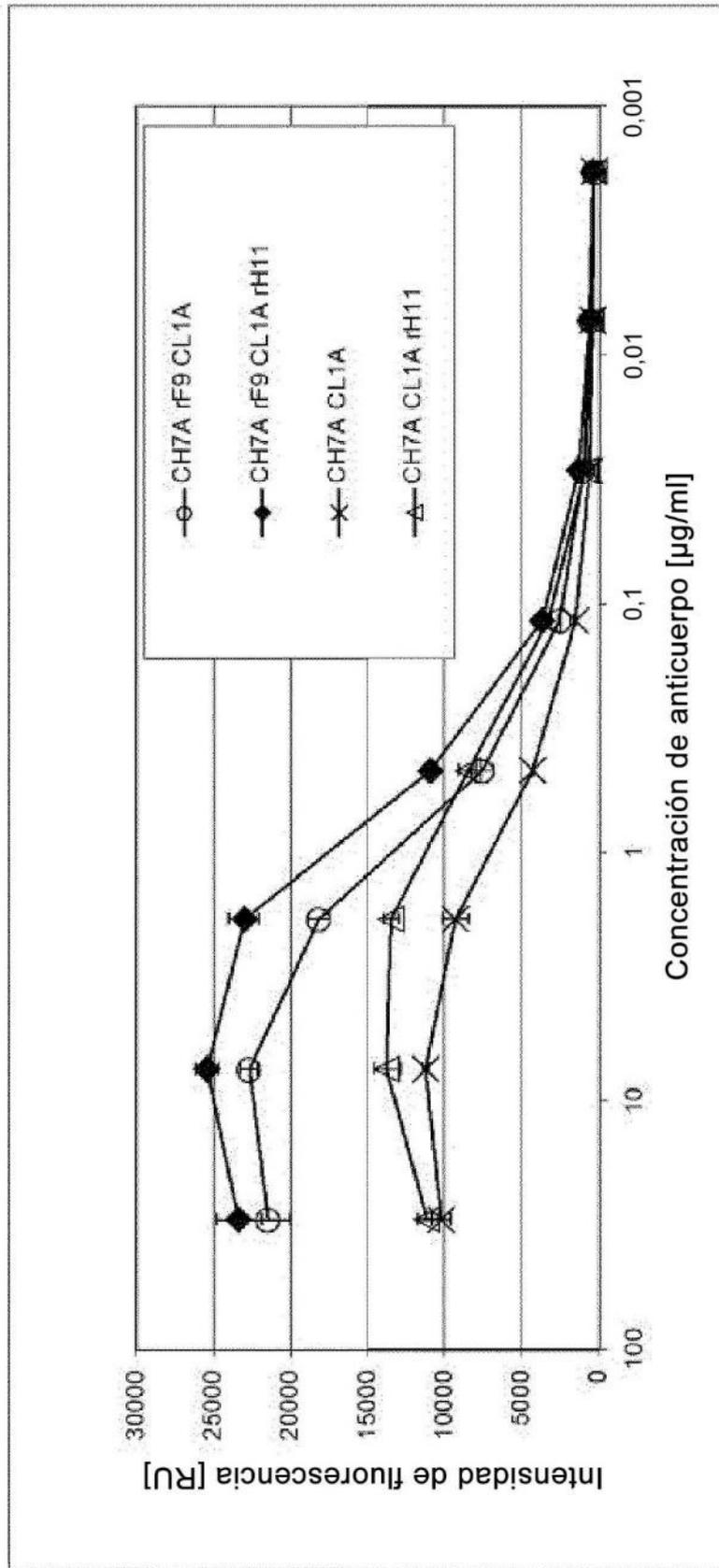


Fig. 6

Modelo de metástasis hepática LS174T

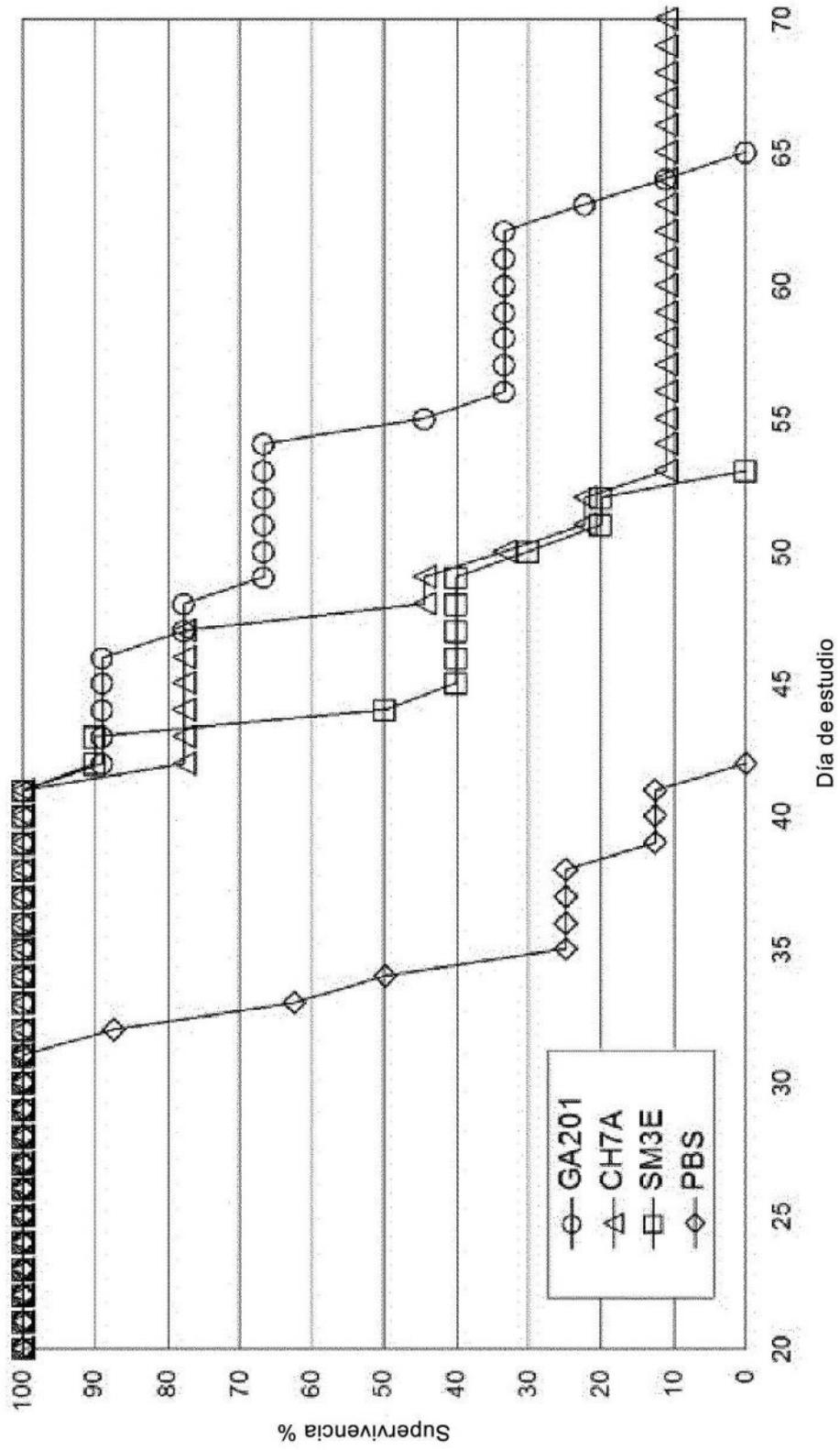


Fig. 7

Modelo de metástasis pulmonar A549

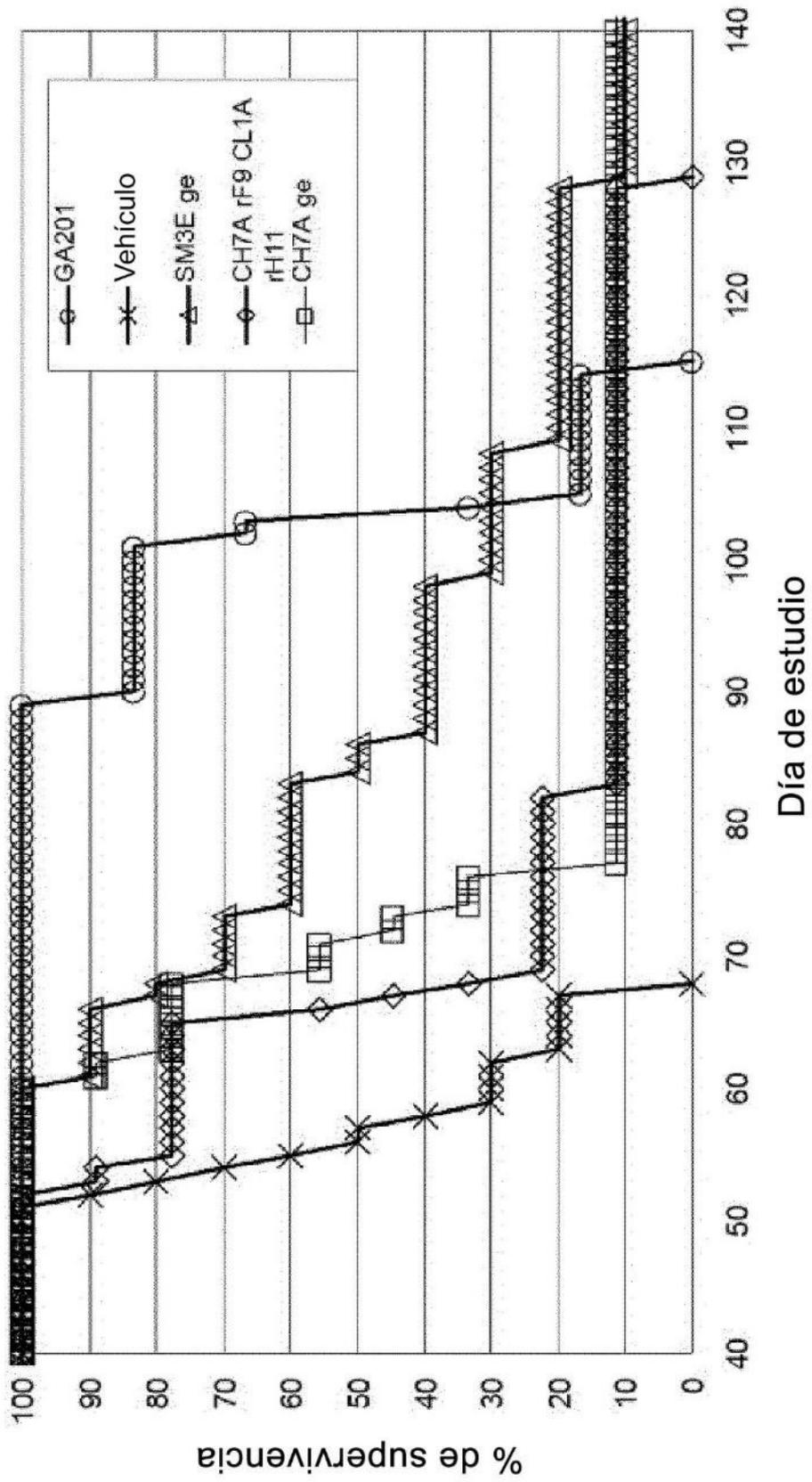


Fig. 8

Modelo de metástasis hepática MKN45

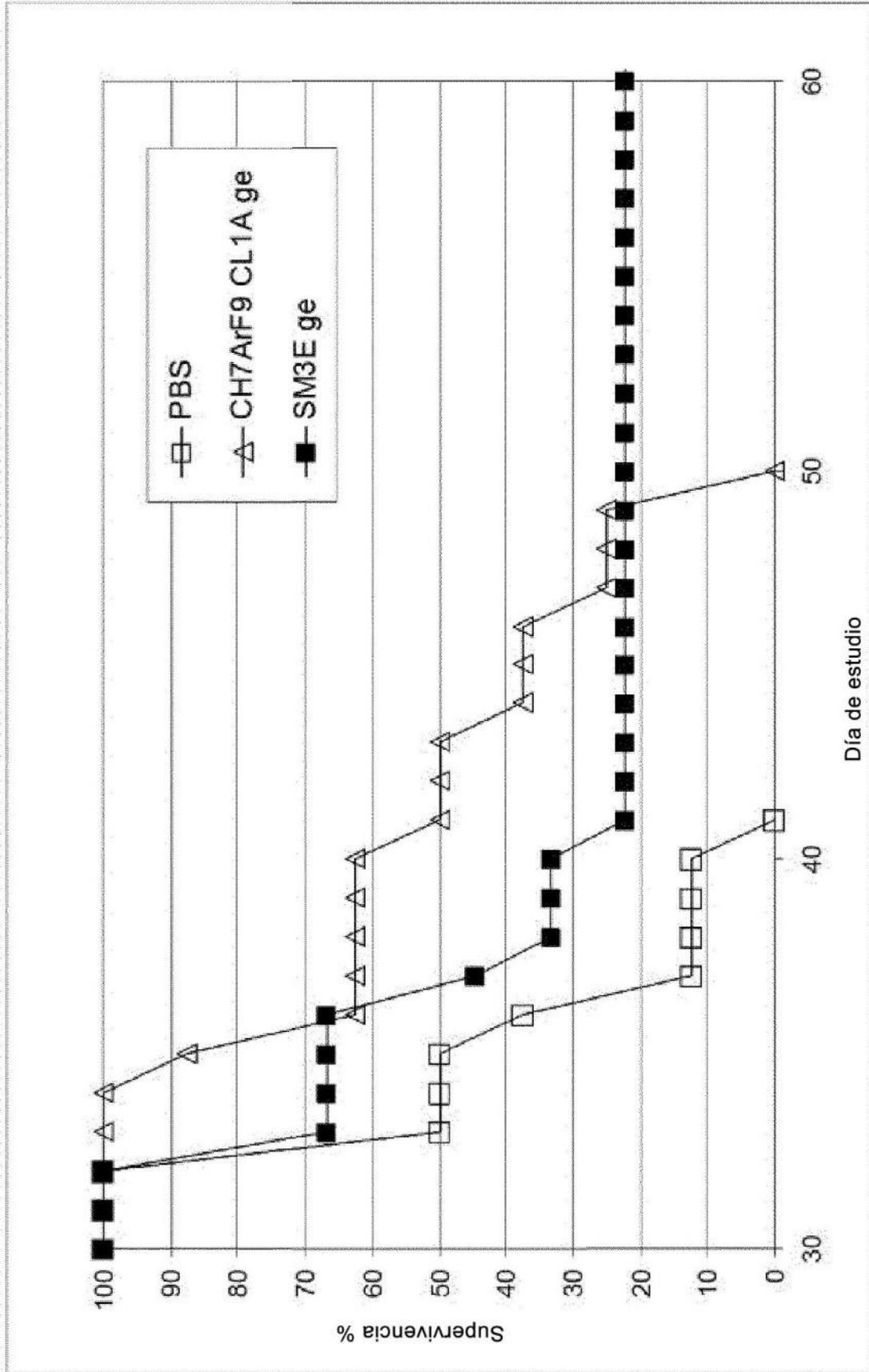
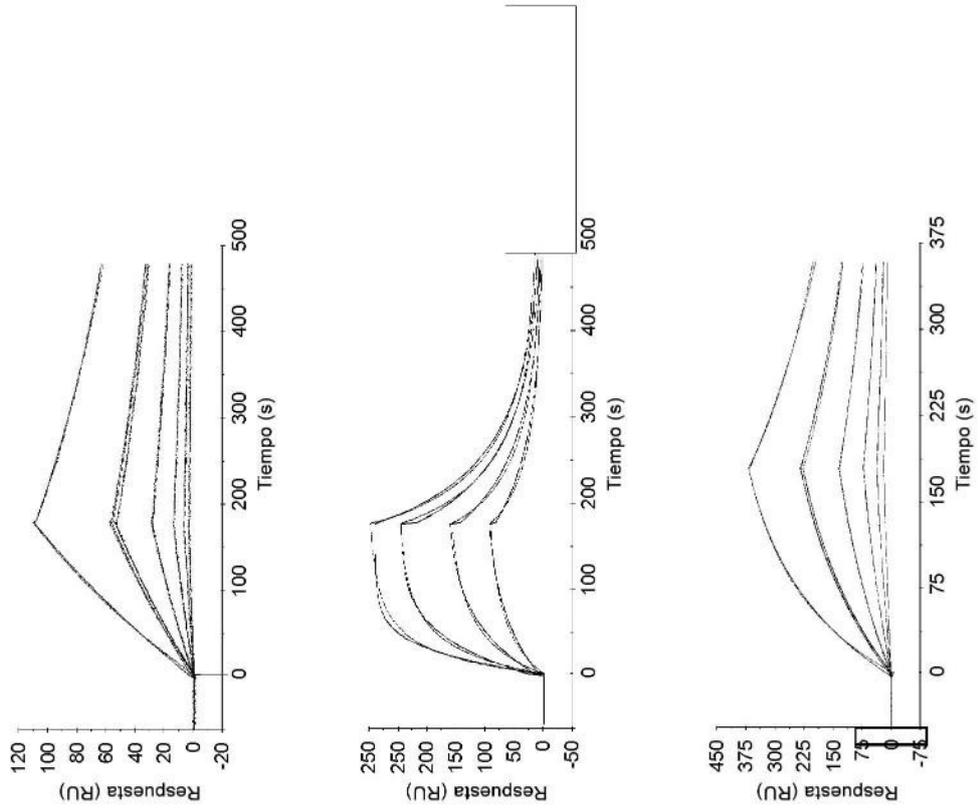


Fig 9

Sensograma de Fab anti-CEA



k_a : $0,527 \times 10^3$
 k_d : 0,0027
 KD: 518 nM

CH7A H4E9 CL1A

k_a : $9,57 \times 10^4$
 k_d : 0,0206
 KD: 216 nM

CH7A CL1A pAC18

k_a : $3,64 \times 10^4$
 k_d : 0,0035
 KD: 96 nM

CH7A H4E9 CL1A pAC18

Fig. 10

aleatorización CDR1 y CDR2 VH (CH7A)

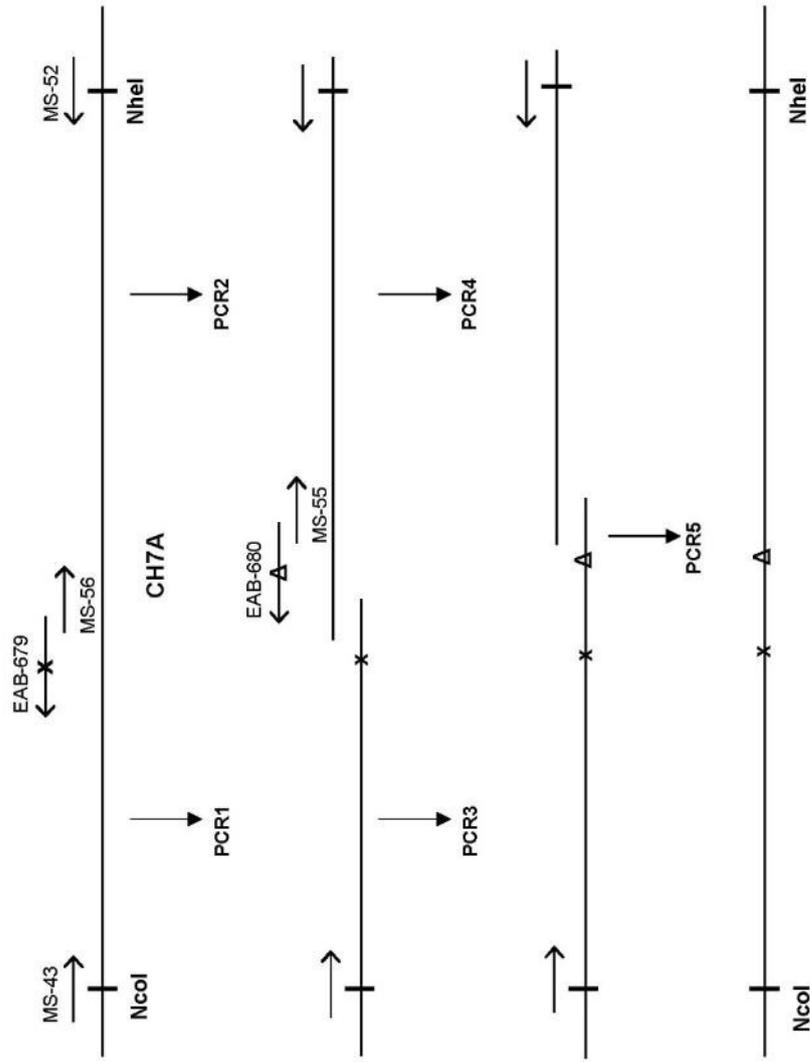


Fig. 11

aleatorización CDR1 y CDR2 VL (CL1A)

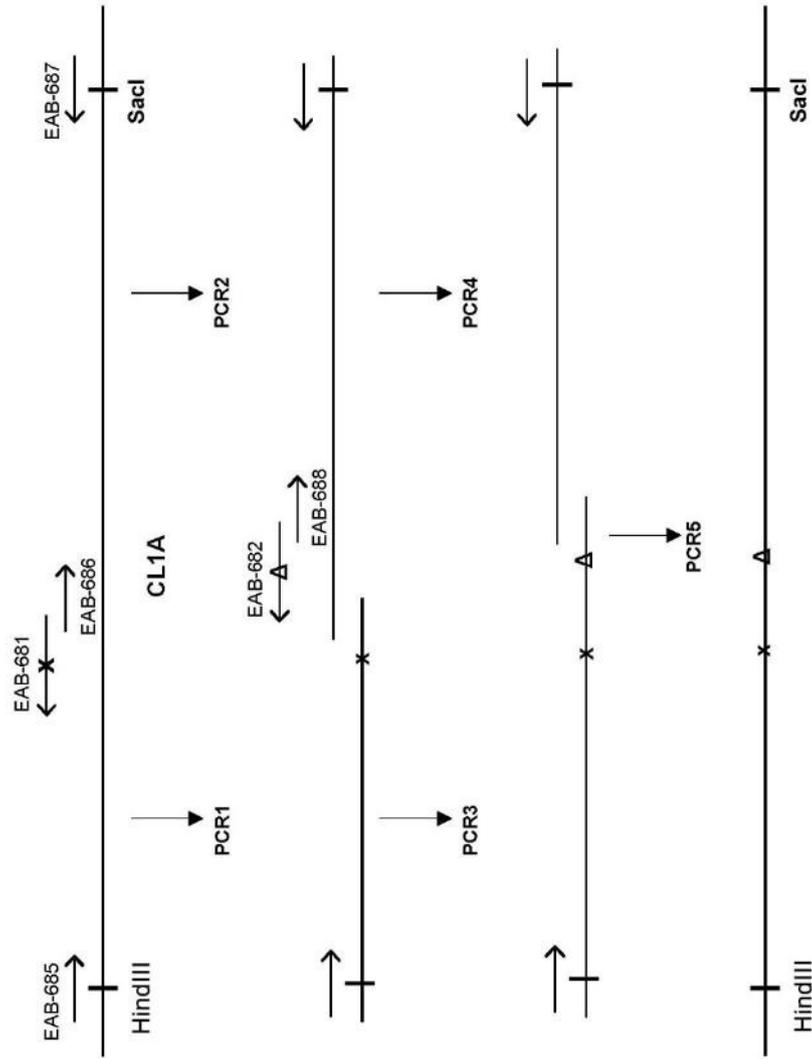


Fig. 12

aleatorización CDR3 VH (CH7A)

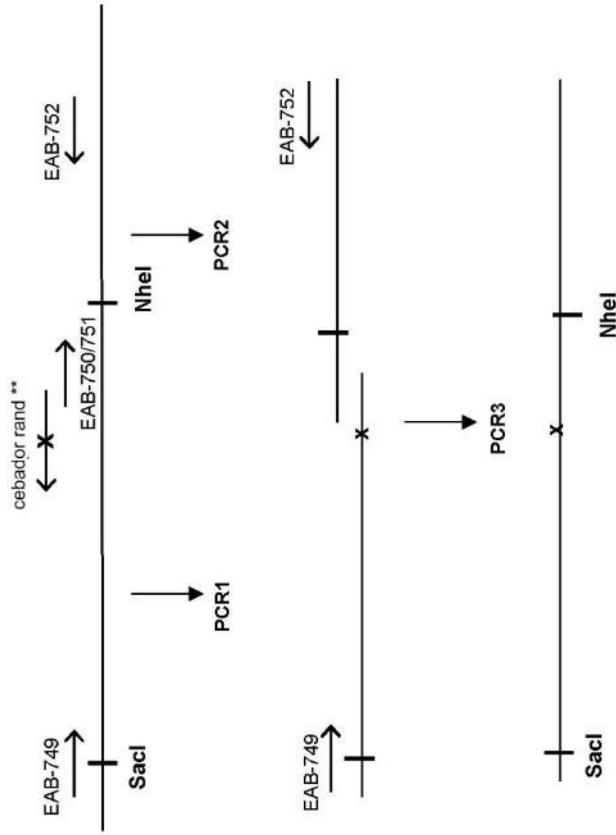


Fig. 13

aleatorización CDR3 VL (CL1A)

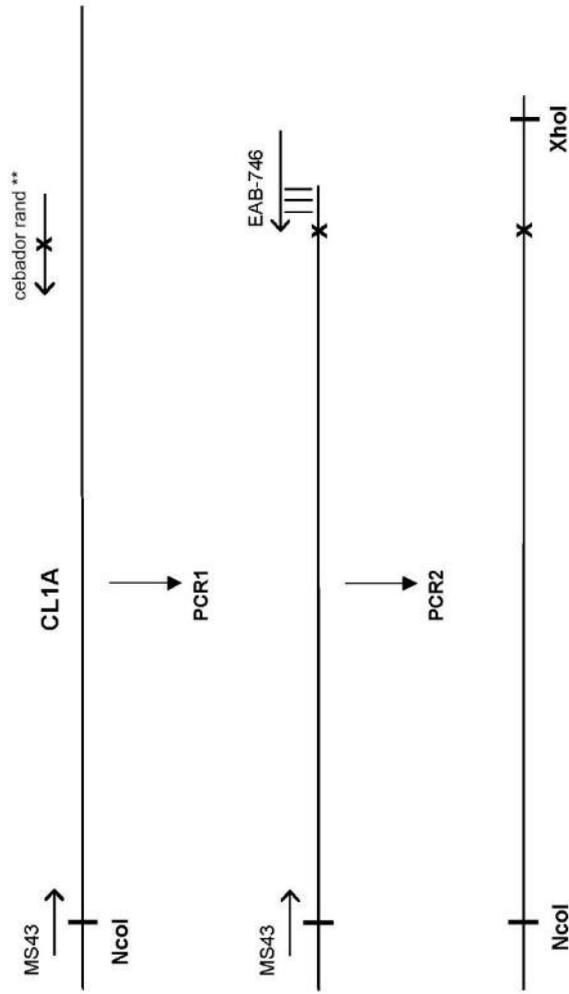


Fig. 14

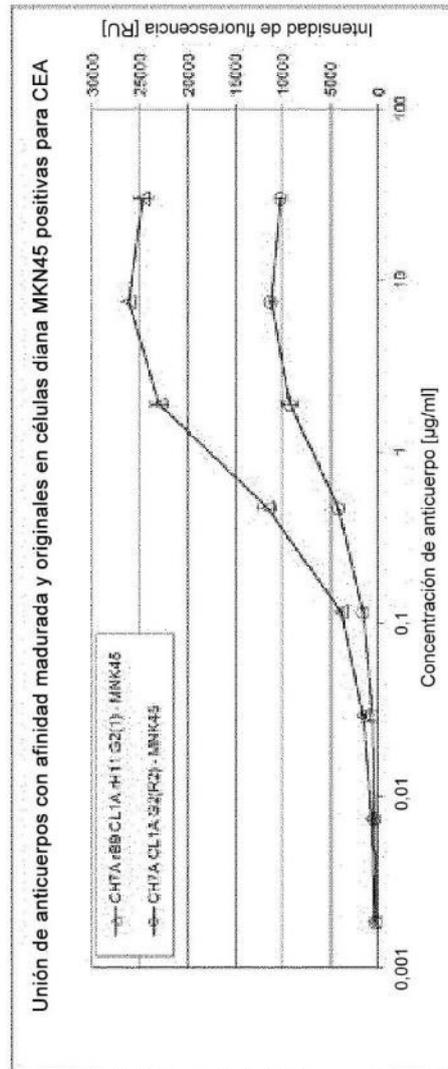
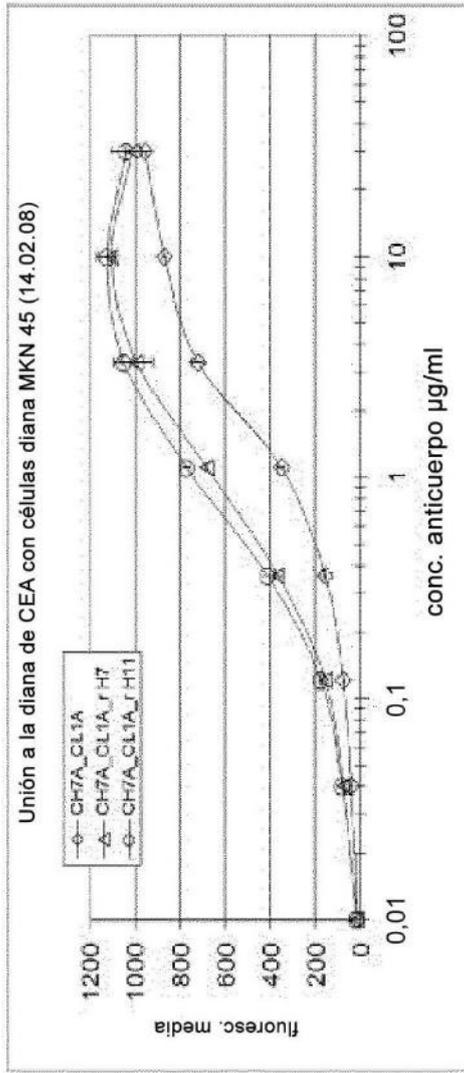


Fig. 15

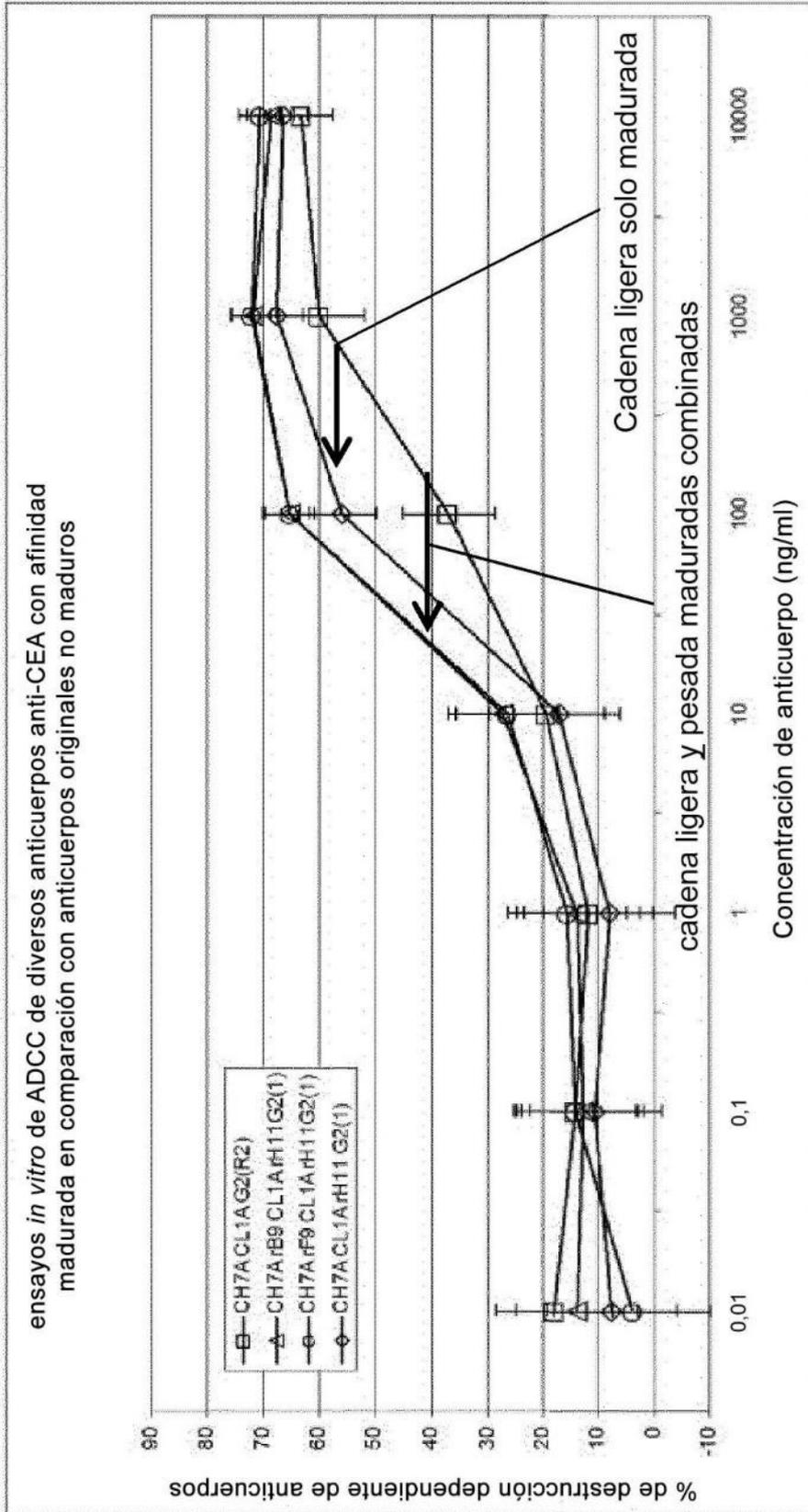


Fig. 16

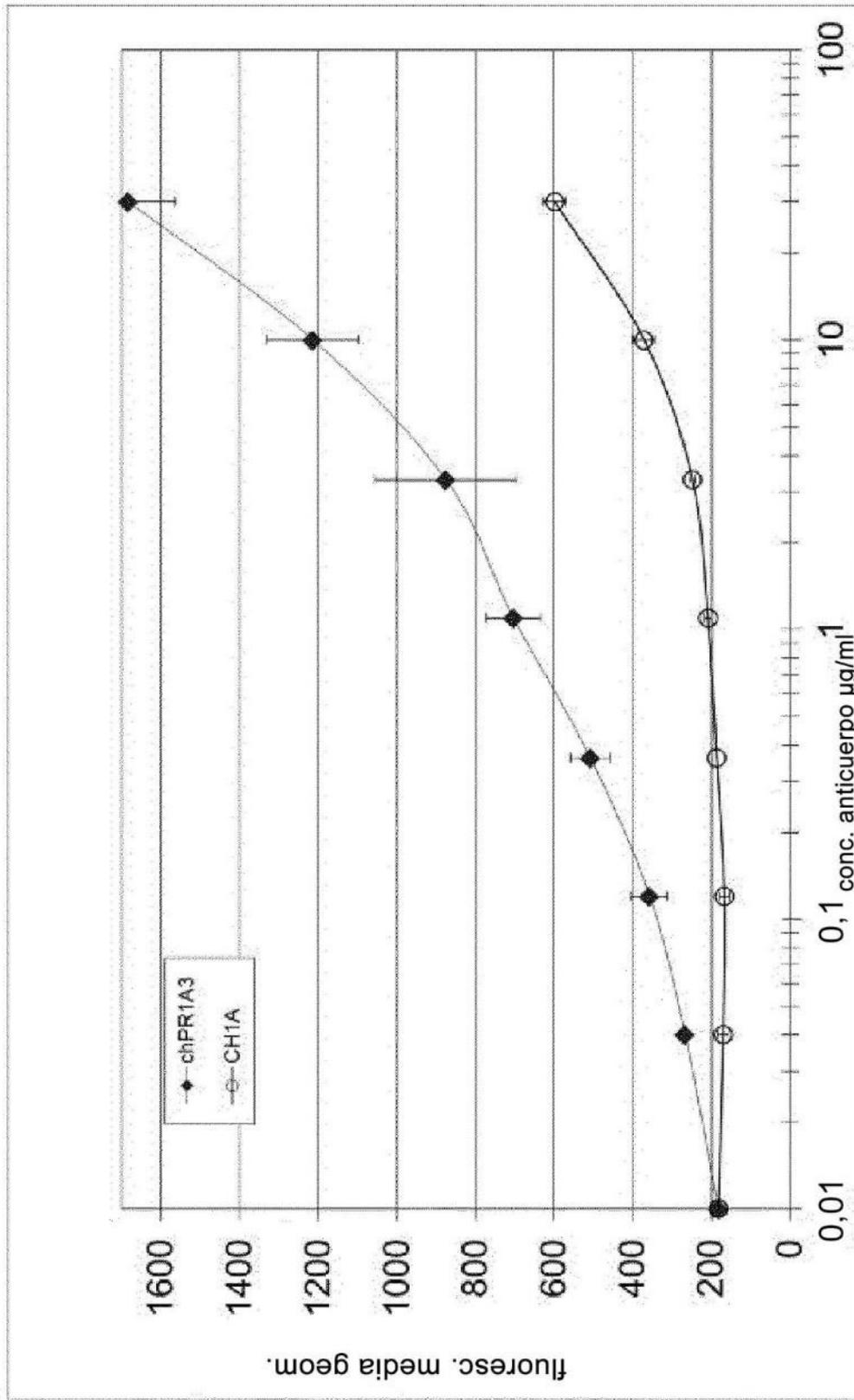


Fig. 17

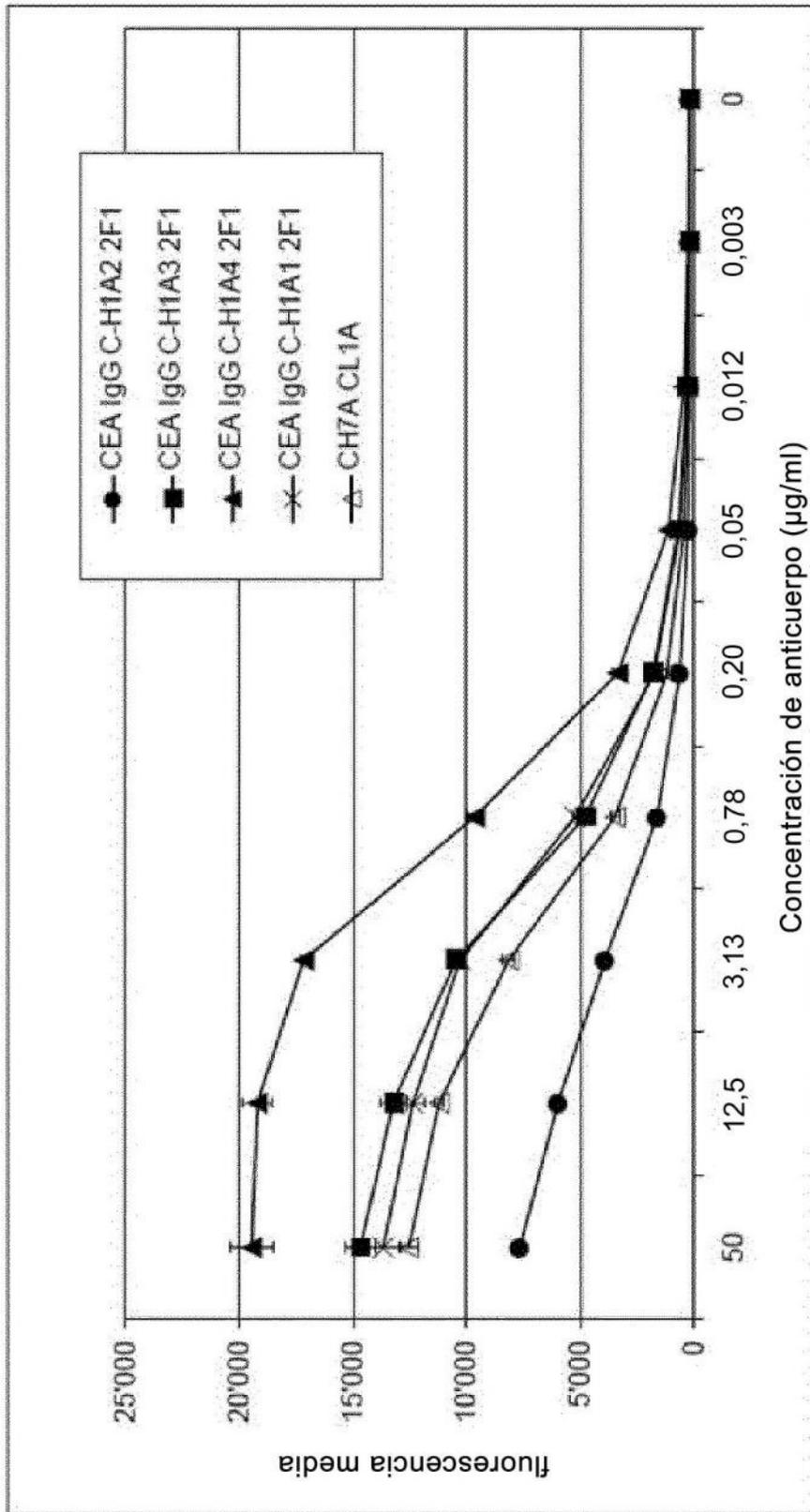


Fig. 18

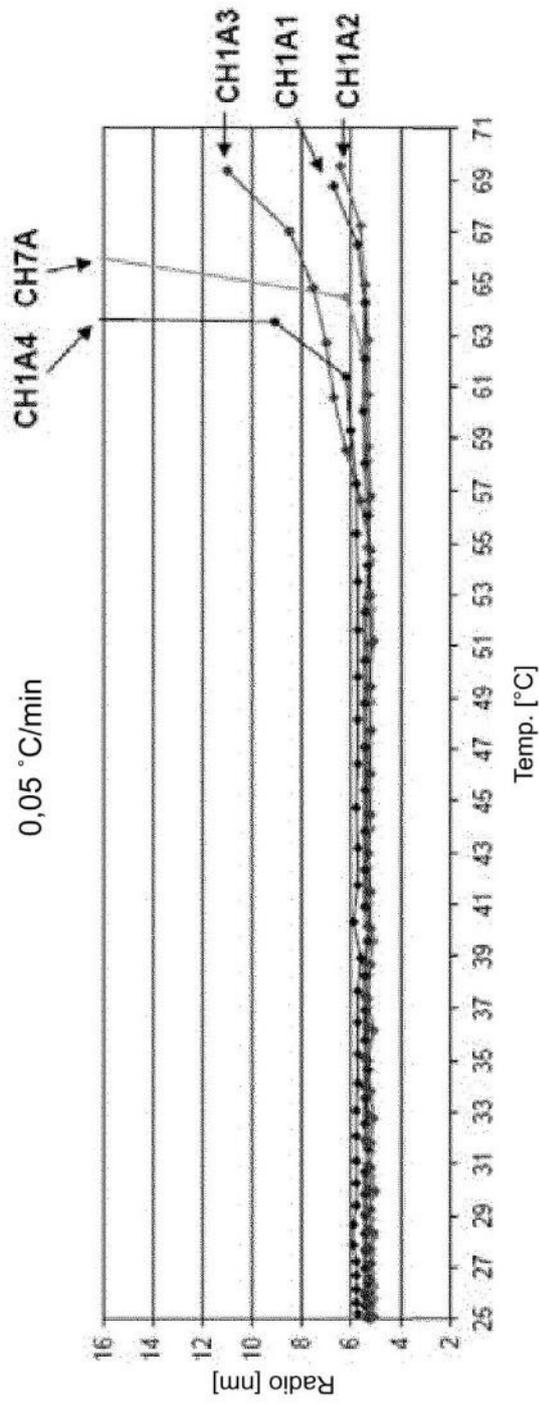


Fig. 19

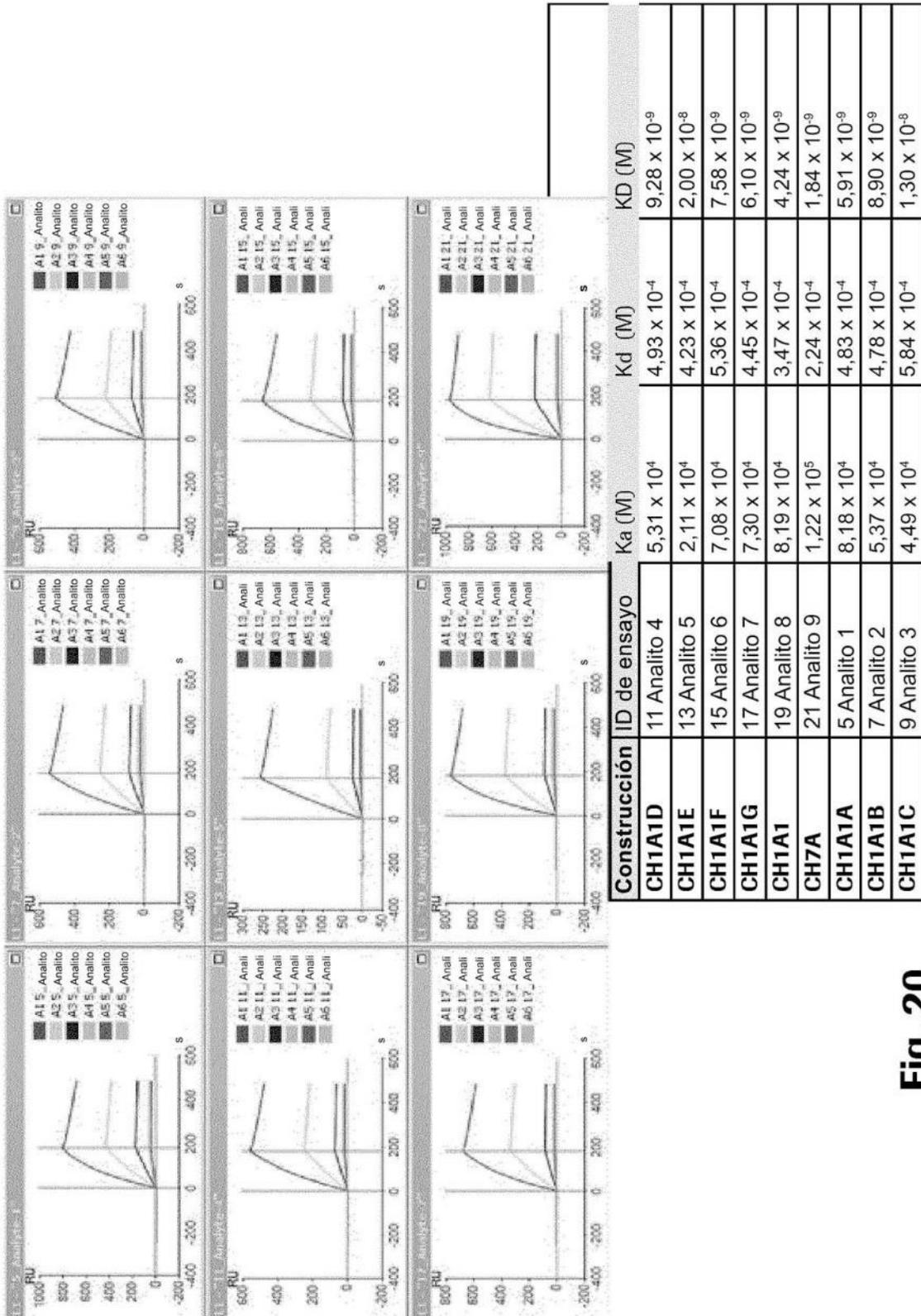


Fig. 20

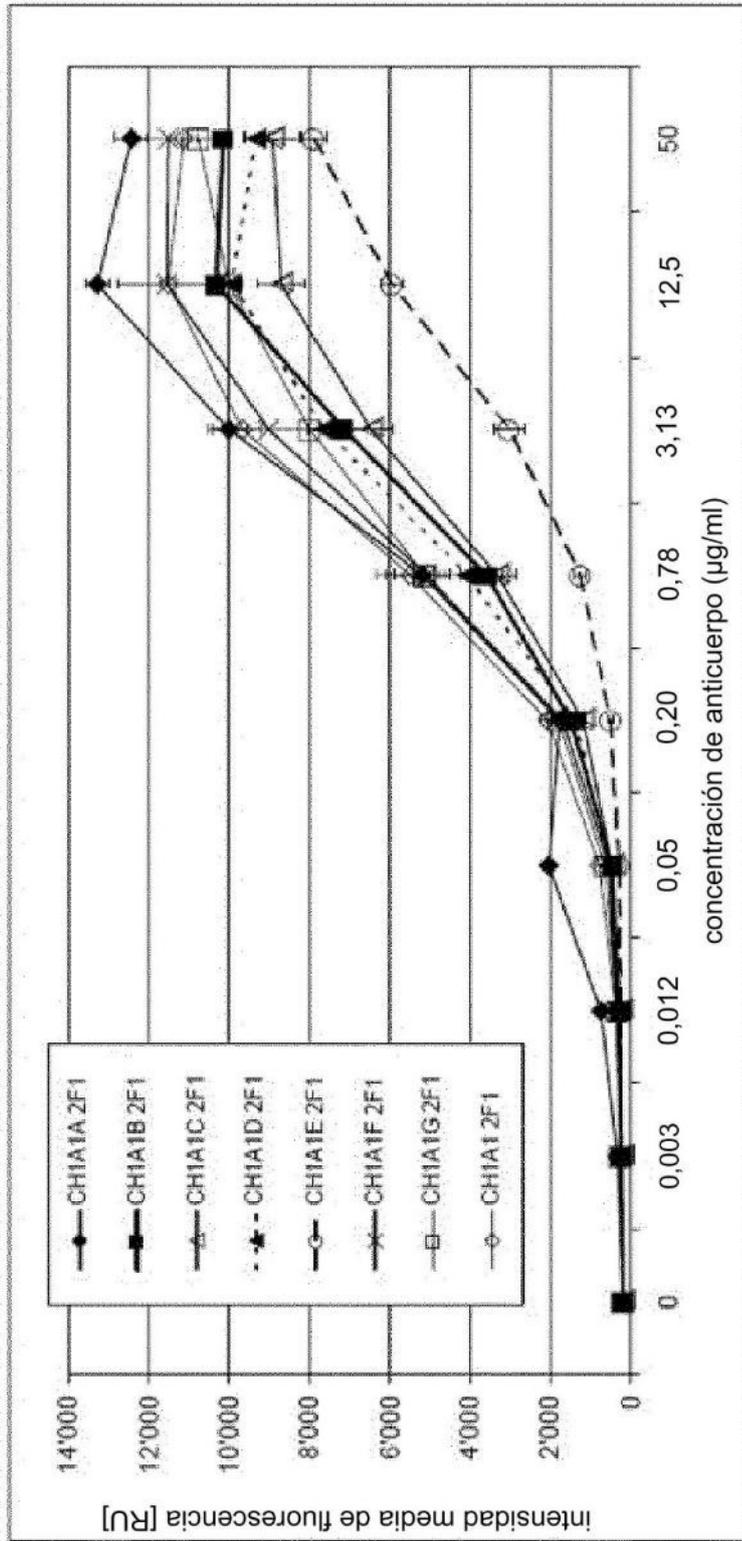
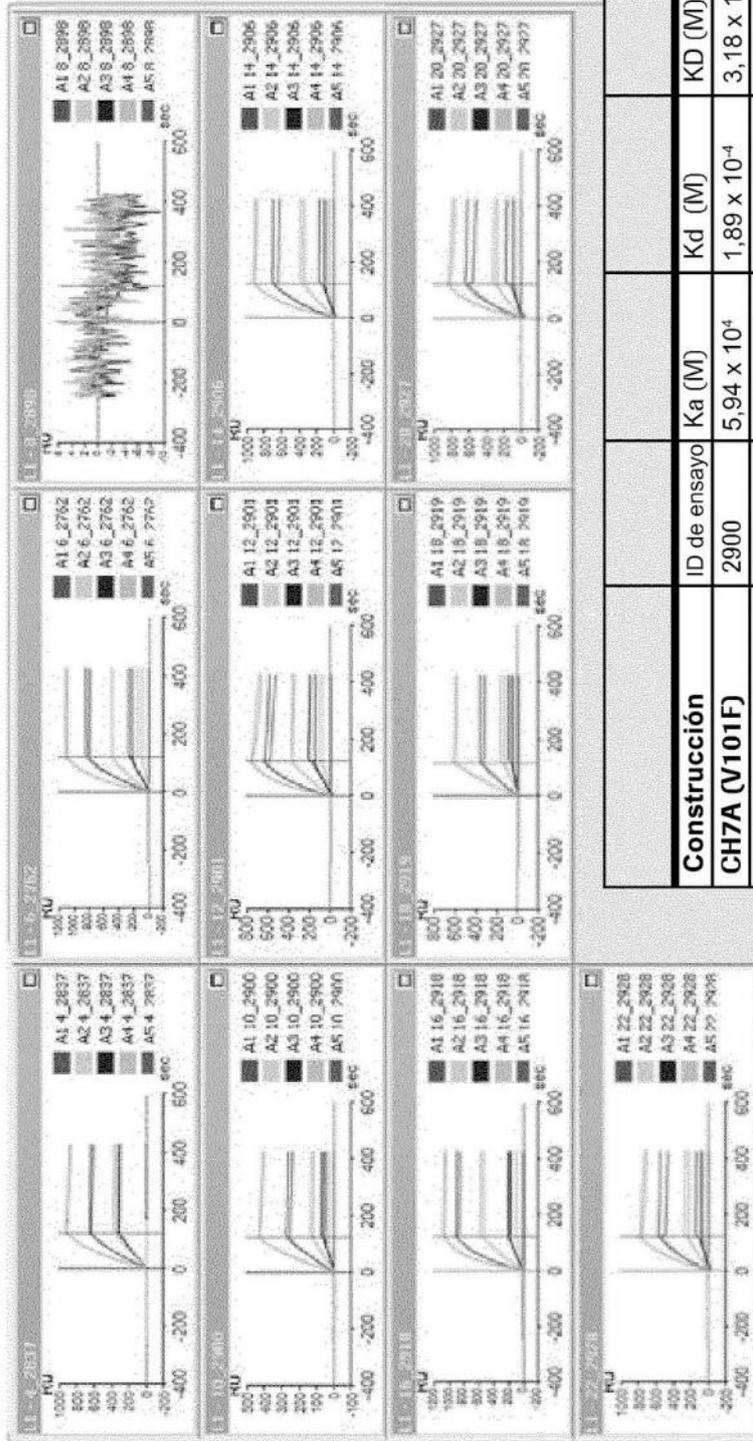


Fig. 21



Construcción	ID de ensayo	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH7A (V101F)	2900	$5,94 \times 10^4$	$1,89 \times 10^{-4}$	$3,18 \times 10^{-9}$
CH7A (E102Q)	2901	$1,98 \times 10^5$	$3,24 \times 10^{-4}$	$1,63 \times 10^{-9}$
CH7A (Y98A)	2906	$1,32 \times 10^5$	$6,86 \times 10^{-5}$	$5,20 \times 10^{-10}$
CH7A (Y98A/D99Y)	2918	$2,36 \times 10^5$	$4,40 \times 10^{-5}$	$1,86 \times 10^{-10}$
CH7A (A103T)	2919	$2,51 \times 10^4$	$7,20 \times 10^{-5}$	$2,87 \times 10^{-9}$
CH7A (D99Y)	2927	$1,14 \times 10^5$	$1,97 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-9}$
CH7A (D99H)	2928	$8,65 \times 10^4$	$1,95 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-9}$
CH7A CL1A 2F1	2837	$1,32 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-9}$
5HFF12 2F1	2762	$1,52 \times 10^5$	$1,94 \times 10^{-5}$	$1,28 \times 10^{-10}$
CH7A (W95Y)	2898	$5,61 \times 10^{-4}$	109,73	$1,95 \times 10^5$

Fig. 22

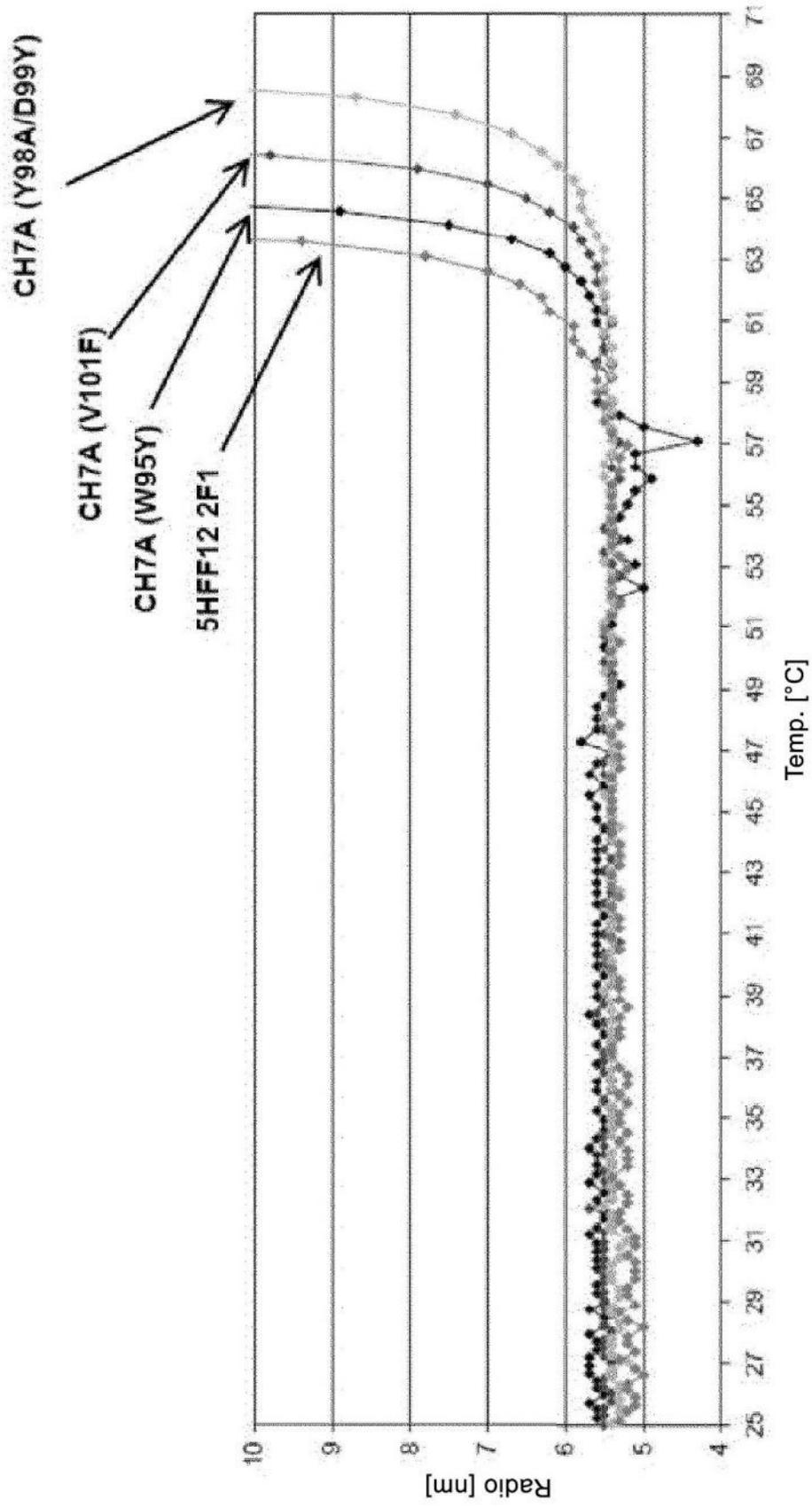


Fig. 23

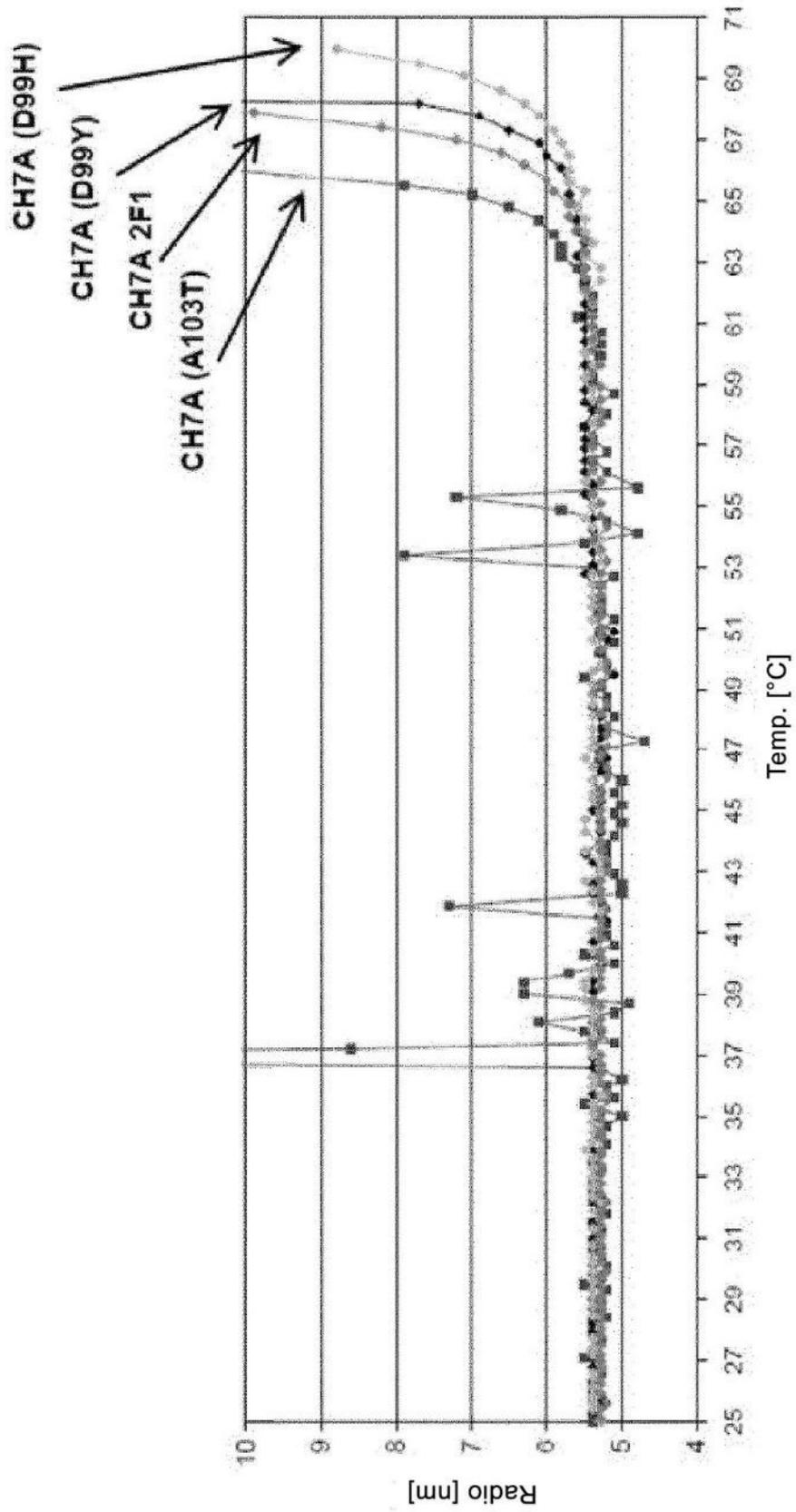
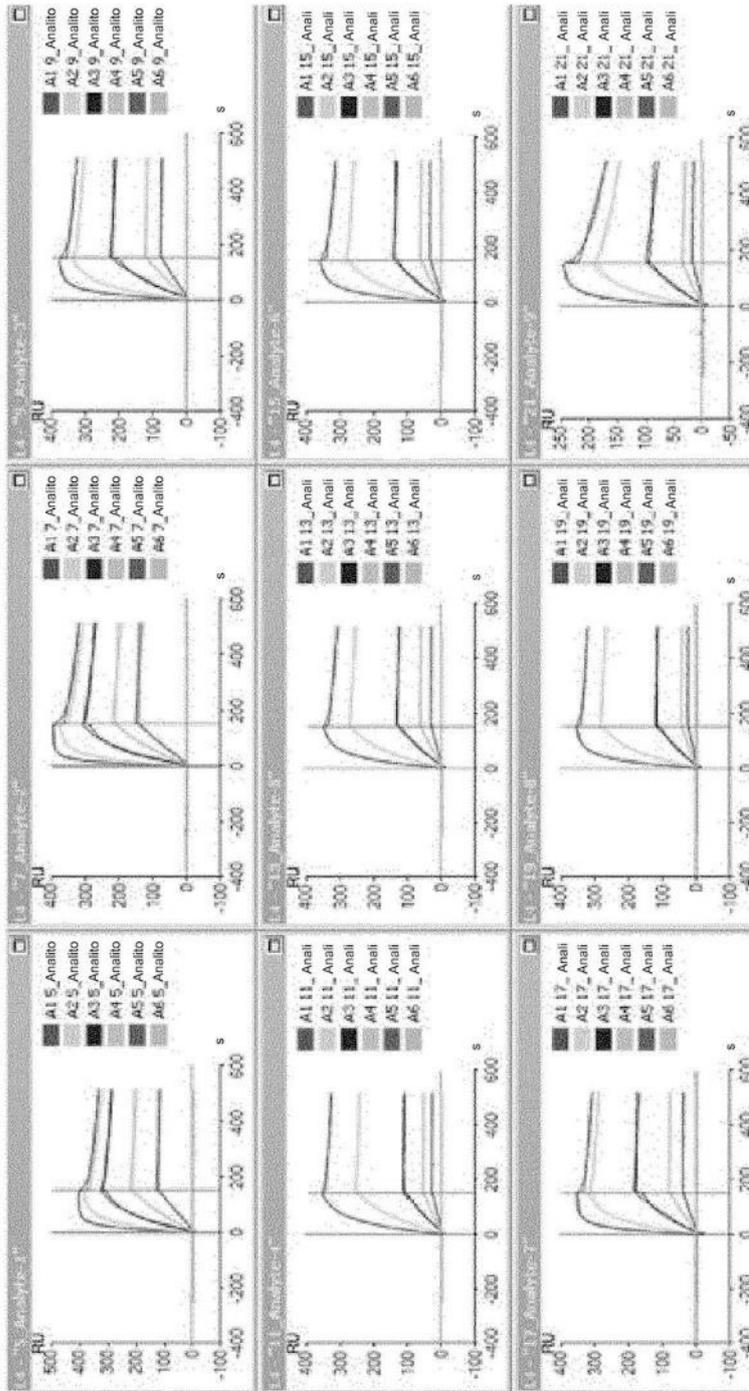


Fig. 24



Construcción	ID de ensayo	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH1B 5L1A10 2F1	11 Analito 4	$2,21 \times 10^5$	$1,54 \times 10^{-4}$	$6,98 \times 10^{-10}$
CH1A1A 5L1A10 2F1	13 Analito 5	$2,80 \times 10^5$	$2,18 \times 10^{-4}$	$7,80 \times 10^{-10}$
CH1A1B 5L1A10 2F1	15 Analito 6	$3,30 \times 10^5$	$2,47 \times 10^{-4}$	$7,47 \times 10^{-10}$
CH7A (Y98A/D99Y) 2F1	17 Analito 7	$4,81 \times 10^5$	$2,24 \times 10^{-4}$	$4,65 \times 10^{-10}$
5L1A10 2F1	19 Analito 8	$3,36 \times 10^5$	$1,78 \times 10^{-4}$	$5,29 \times 10^{-10}$
CH7A 2F1	21 Analito 9	$3,69 \times 10^5$	$7,27 \times 10^{-4}$	$1,97 \times 10^{-9}$
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1	5 Analito 1	$6,28 \times 10^5$	$3,37 \times 10^{-4}$	$5,37 \times 10^{-10}$
CH1A1B (Y98A/D99Y) 2F1	7 Analito 2	$7,11 \times 10^5$	$3,61 \times 10^{-4}$	$5,07 \times 10^{-10}$
CH1B (Y98A/D99Y) 2F1	9 Analito 3	$4,19 \times 10^5$	$2,45 \times 10^{-4}$	$5,85 \times 10^{-10}$

Fig. 25

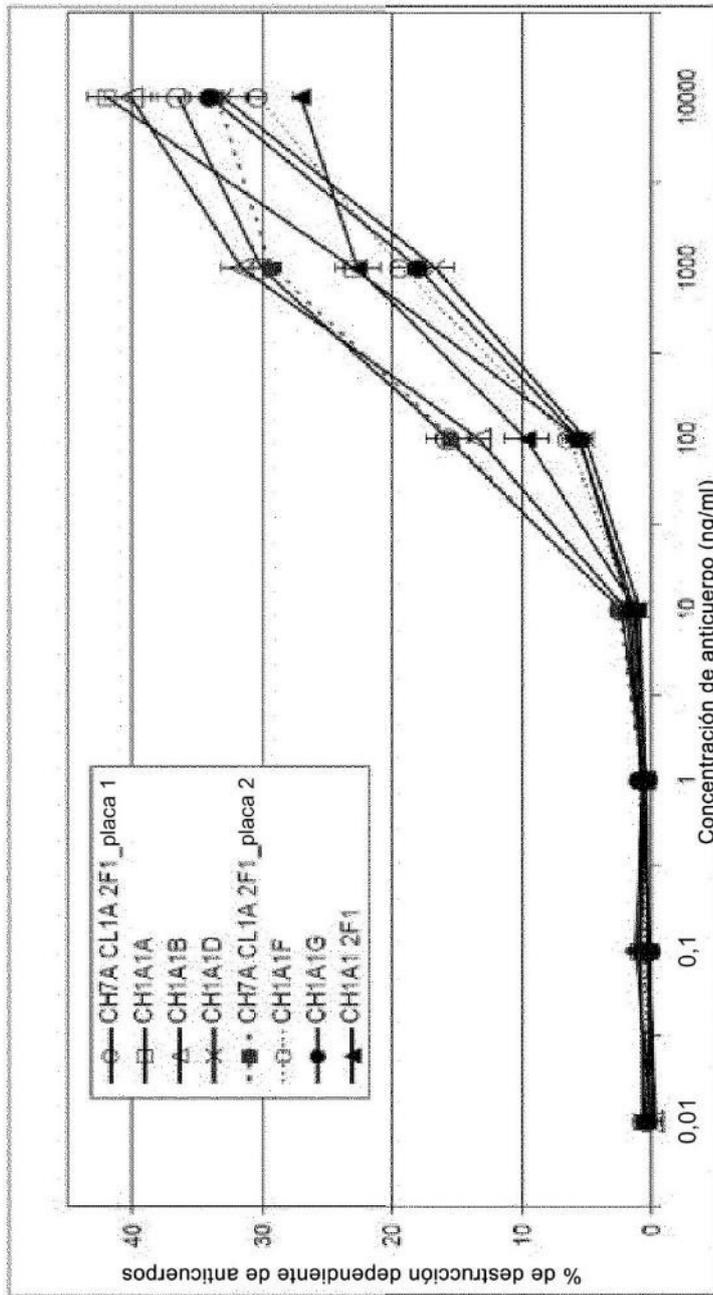


Fig. 26

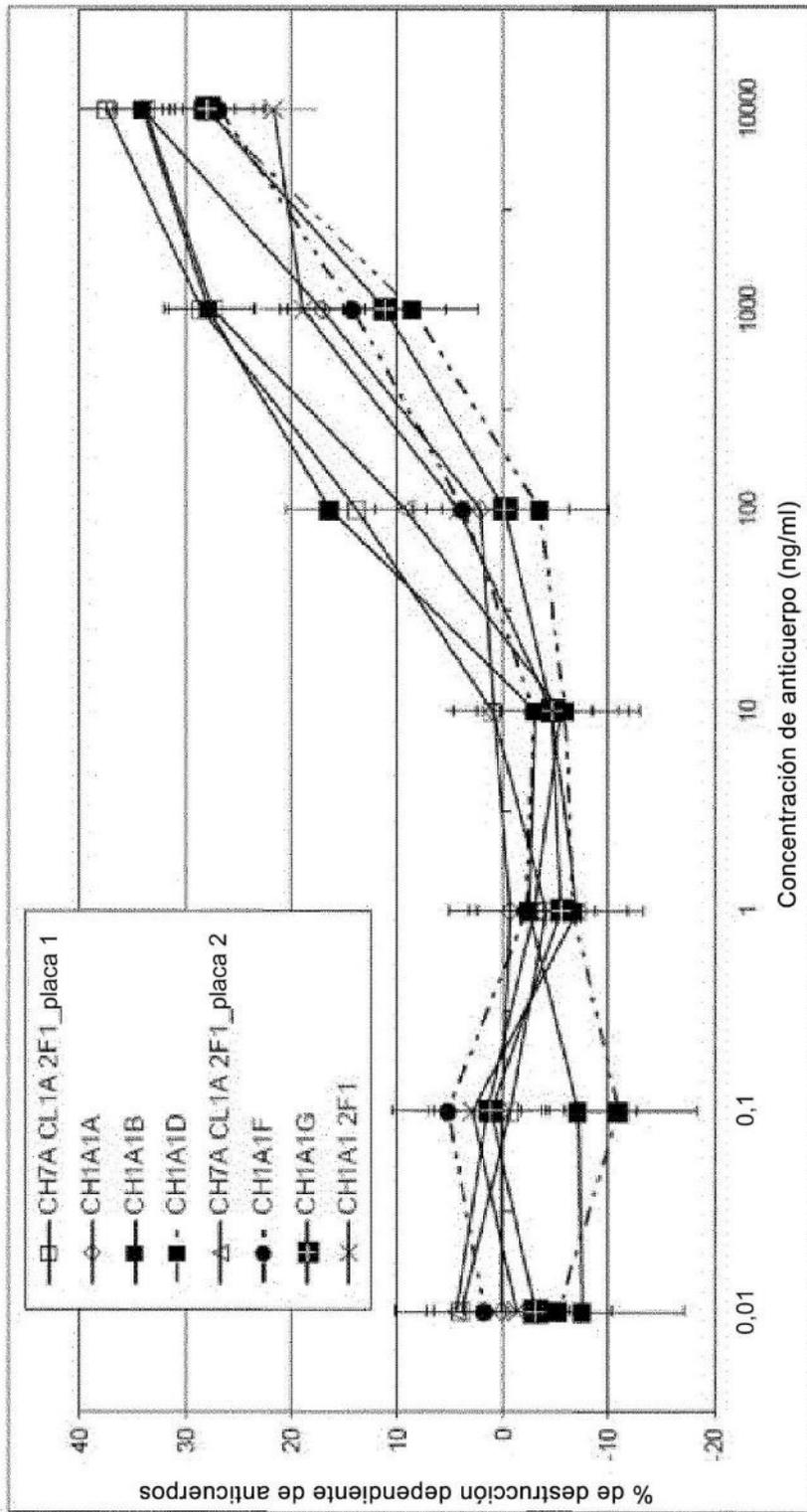


Fig. 27

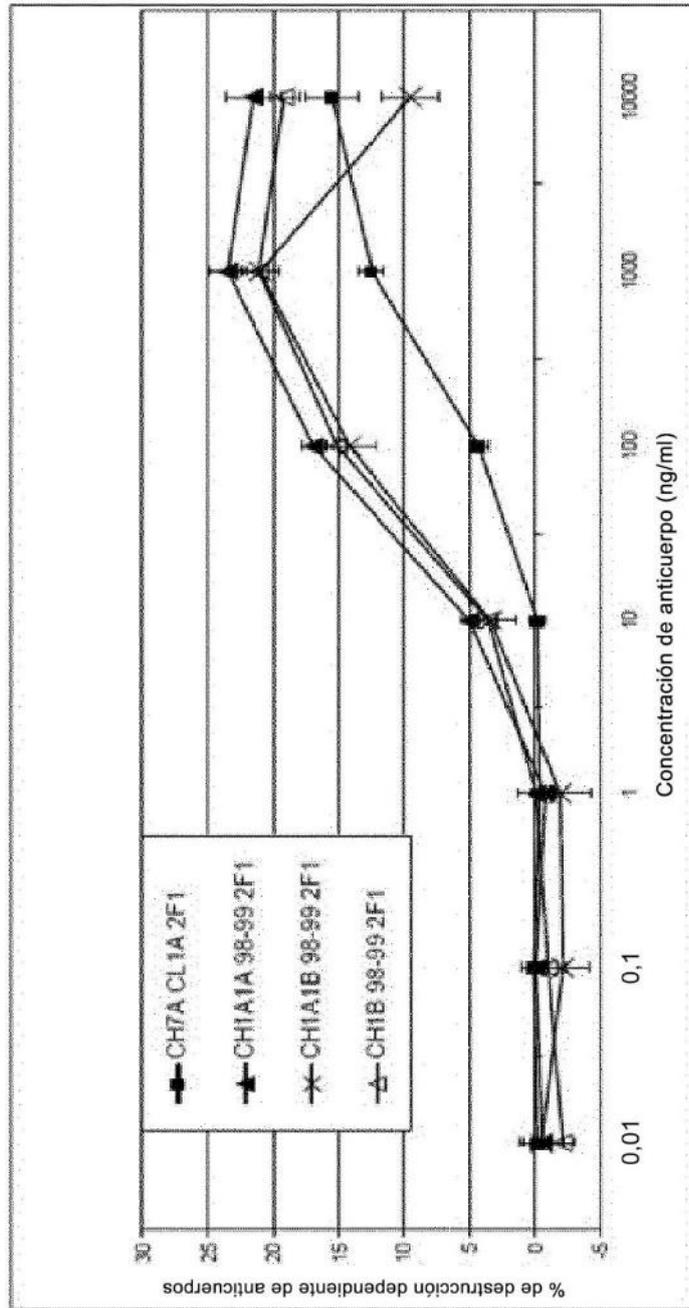


Fig. 28

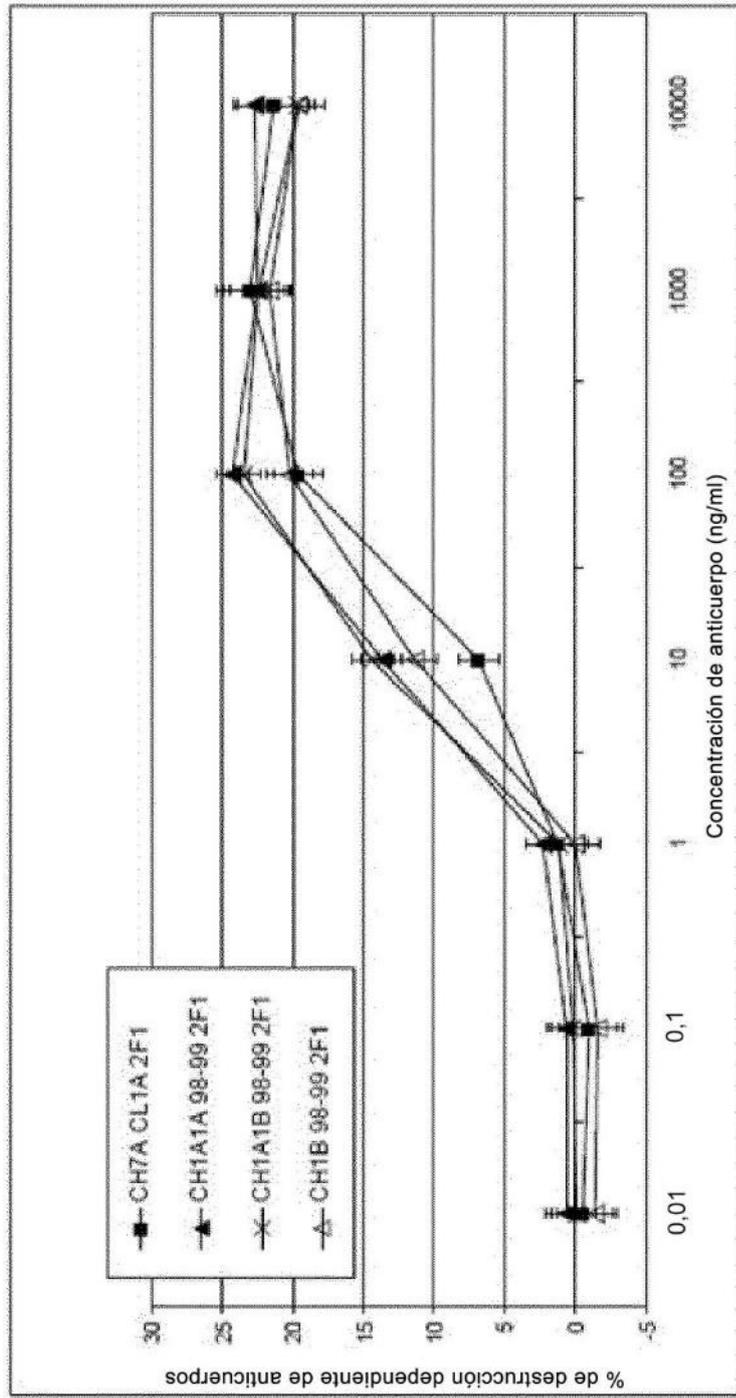


Fig. 29

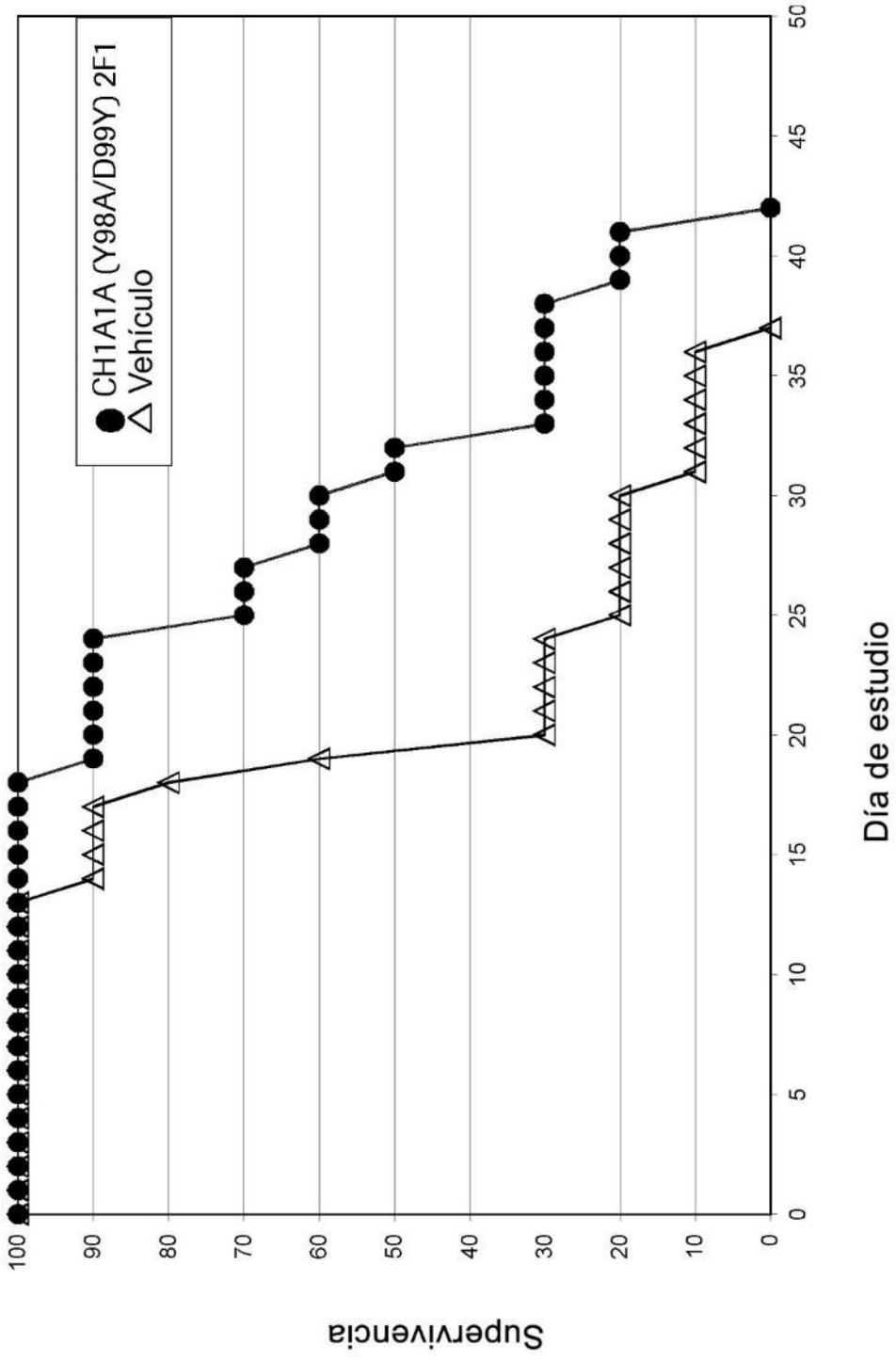


Fig. 30

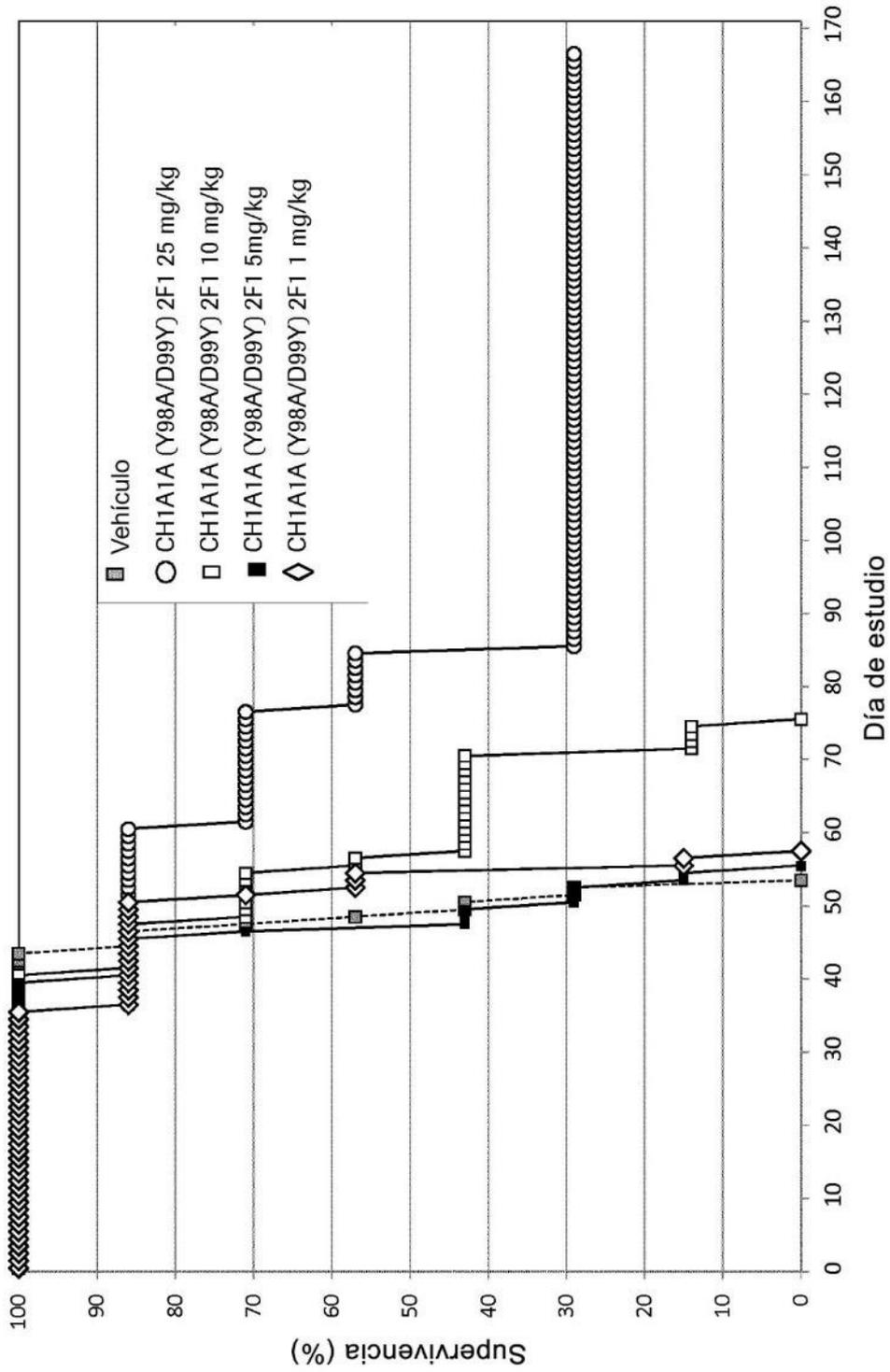


Fig. 31

CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
CDR1 de cadena ligera	KASQNVGTNVA	36
	KASANVGNVA	37
	KASKNVGTNVA	38
	KASAAVGTVA	39
	KASQYASTNVA	40
	KASHNVGTNVA	41
	KASQIMGNVA	42
	KASQIVGTNVA	43
	KASQKVLNVA	44
	KASQTVSANVA	45
CDR2 de cadena ligera	SASYRYS	46
	YLASNLSG	47
	YLASYPQI	48
	YSASYRKR	49
	YWASYRYS	50
	YSASHRYS	51
	YLASYHES	52
	YSASHRPS	53
	YLASYRYS	54
	YLASYRYR	55
CDR3 de cadena ligera	HQYYTYPLFT	56

CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
CDR1 de cadena pesada	EFGMN	1
	EYGMN	2
	EYSMN	3
	EFGMS	5
	GYTFTEF	6
	GYTFTEY	7
	GYTFTEFGMN	8
	GYTFTEYGMN	9
	GYTFTEYSMN	10
	GYTFTEFGMS	12
CDR2 de cadena pesada	WINTKTGEATVVEEFKG	13
	WINTKTGEATYIEEFKG	14
	WINTKSGEATVVEEFKG	15
	YINTKNGEANVVEEFKG	16
	WINTKNGEATYIEEFKG	17
	NTKTGEAT	18
	NTKSGEAT	19
	NTKNGEAN	20
	WINTKTGEAT	21
	WINTKSGEAT	22
CDR3 de cadena pesada	YINTKNGEAN	23
	WINTKNGEAT	24
	WDFYDYVEAMDY	25
	WDFYHYVEAMDY	26
	WDFVDYVEAMDY	27
	WDFYWYVEAMDY	28
	WDAFEYVKALDY	29
	WDFFEYFKTMDY	30
	WDFFYVQTMIDY	31
	WDFSYVEAMDY	32
WDFAHYFQTMIDY	33	
WDFAYYFQTMIDY	34	
WDFAYYLEAMDY	35	

Fig. 32

SEQ ID NO:	CONSTRUCCIÓN DE CADENA LIGERA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
207	pAC21 (3A1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASANVGNVAVYQQKPGKAPKLLIYLASNRSRGGVPSRFSGS SGSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
208	pAC19 (2C6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASKNVGTNAVYQQKPGKAPKPLIYASYPQIGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
209	pAC18 (2F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGYVAVYQQKPGKAPKLLIYASVYKRGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
210	pAC23 (2F11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQIASTNAVYQQKPGKAPKLLIYASVYSGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
211	H4E9 cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTNAVYQQKPGKAPKPLIYASVYSGVPSRFSGS SGSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
212	L2D2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASHNVGTNAVYQQKPGKAPKLLIYASVYSGVPSRFSGS SGSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
213	pAC6 (C1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQIMGNVAVYQQKPGKAPKLLIYASVYSGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
214	pAC7 (E10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQIVGTNAVYQQKPGKAPKLLIYASVYSGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
215	pAC12 (H7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQVLTNAVYQQKPGKAPKLLIYASVYSGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT
216	pAC13 (H11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQTVSANVAVYQQKPGKAPKLLIYASVYSGVPSRFSGS GSGTDFLTLISSLQPEDFATYCHQYYTYPLTFGGQGTKLEIKRT

Fig. 33

SEQ ID NO:	CDR-H3 (los residuos aleatorizados son los residuos seleccionados subrayados en negrita)	Afinidad (determinada por Biacore)	Construcción
25	<u>WDFYDYVEAMDY</u>	3681 nM	PMS22
26	WDFYHYVEAMDY	586 nM	1C8
27	WDFVDYVEAMDY	1893 nM	3E1
28	WDFYWYVEAMDY	746 nM	2D7
33	WDFAHYFQTM DY	59 nM	CDRH-3 con afinidad madurada
34	WDFAYYFQTM D	44 nM	CDRH-3 con afinidad madurada
35	WDFAYYLEAMD	69 nM	CDRH-3 con afinidad madurada
29	WDAFEYVKALDY	26 nM	H3 completa (5) 19
30	WDFFEYFKTM DY	51 nM	H3 completa (5) 8
31	WDFFYVYVQTM DY	81 nM	H3 completa (5) 28
33	WDFSYVEAMDY	132 nM	H3 completa (5) 27
	CDR-H1 y CDR-H2		
1 y 13	EFGMN y <u>WINTKTGEATYVEEFKG</u>	3681 nM	pMS22
1 y 14	EFGMN y <u>WINTKTGEATYIEEFKG</u>	402 nM	H4E9
1 y 15	EFGMN y <u>WINTKSGEATYVEEFKG</u>		pAC14 (B9)
2 y 15	EYGMN y <u>WINTKSGEATYVEEFKG</u>		pAC15 (F9)
3 y 16	EYSMN y <u>YINTKNGEANYVEEFKG</u>		H1/H2 (5) 2

Fig. 34A

SEQ ID NO:	CDR-H3 (los residuos aleatorizados son los residuos seleccionados subrayados en negra)	Afinidad (determinado por Biacore)	Construcción
2 y 17	EYGMN and WINTKNGEATYIEEFKG		H1/H2 (5) 11
1 y 16	EFGMN and YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 13
2 y 16	EYGMN and YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 14
5 y 13	EFGMS and WINTKTGEATYVEEFKG	26 nM	H3 Full (5) 19
	CDR-L1 y CDR-L2		
36 y 46	QNVG <u>TN</u> y <u>Y</u> SASYRYS	3681 nM	pMS22
37 y 47	ANVG <u>NN</u> y YLAS <u>N</u> LSG	250 nM	pAC21 (3A1)
38 y 48	KNVG <u>TN</u> y YLAS <u>Y</u> PQI	700 nM	pAC19 (2C6)
39 y 49	AA VG <u>T</u> Y y <u>Y</u> SASYR <u>KR</u>	220 nM	pAC18 (2F1)
40 y 50	<u>Q</u> YAS <u>TN</u> y <u>Y</u> WAS <u>Y</u> RYS	290 nM	pAC23 (2F11)
36 y —	QNVG <u>TN</u> y <u>PLI</u> - <u>Y</u> SASYRYS	402 nM	H4E9
41 y 51	<u>HN</u> VG <u>TN</u> y <u>Y</u> SASH <u>R</u> YS	2255 nM	L2D2
42 y 52	<u>QIM</u> G <u>P</u> N y <u>Y</u> LASY <u>H</u> ES		pAC6 (C1)
43 y 53	<u>QIV</u> G <u>TN</u> y <u>Y</u> SASH <u>R</u> PS		pAC7 (E10)
44 y 54	<u>QK</u> VL <u>TN</u> y <u>Y</u> LASYRYS		pAC12 (H7)
45 y 55	<u>Q</u> TV <u>SAN</u> y <u>Y</u> LASYR <u>YR</u>		pAC13 (H11)
	CDR-L3		
56	H <u>Q</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>T</u>		pMS22

Fig. 34B

NOMBRE DEL CLON	CADENA	AFINIDAD MONOVALENTE	AFINIDAD BIVALENTE
PR1A3	wf/wt	$k_{on}: 6,74 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 2,48 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 3681 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 2,82 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 5,52 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 2 x 10 ⁻⁹ M
1C8	hc/wt	$k_{on}: 12,9 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,76 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 586 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 4,67 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 3,24 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,693 x 10 ⁻⁹ M
H4E9	hc/wt	$k_{on}: 5,22 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,21 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 402 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 2,92 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 2,04 \times 10^{-3}$ 1/s; KD: 0,7 x 10 ⁻⁹ M
H3 Completo (5) 19	hc/wt	$k_{on}: 54,2 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,13 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 24 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 9,02 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 1,75 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,19 x 10 ⁻⁹ M
H3 Completo (5) 18	hc/wt	$k_{on}: 27,3 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,14 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 51 x 10 ⁻⁹ M	N/D
3A1	wf/lc	$k_{on}: 46,8 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 1,17 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 250 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 2,42 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 3,64 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 1,5 x 10 ⁻⁹ M
2F1	wf/lc	$k_{on}: 95,7 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 2,07 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 220 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 4,23 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 4,10 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,952 x 10 ⁻⁹ M
5L1A10	hc/wt	$k_{on}: 15,6 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,09 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 59 x 10 ⁻⁹ M	N/D
5HFF12	hc/wt	$k_{on}: 20,8 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,09 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 44 x 10 ⁻⁹ M	N/D
M4F1	hc/wt	$k_{on}: 25,7 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,17 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 69 x 10 ⁻⁹ M	N/D
H4E9 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 36,4 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,35 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 96 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 4,23 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 1,91 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,452 x 10 ⁻⁹ M
H4E9 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2,46 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 1,36 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,55 x 10 ⁻⁹ M
1C8 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 68,1 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,87 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 128 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 9,68 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 6,36 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,66 x 10 ⁻⁹ M
1C8 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2,89 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 2,57 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,888 x 10 ⁻⁹ M
H3 Completo (5) 19 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 206 \times 10^3$ 1/Ms; $k_{off}: 0,25 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 12,2 x 10 ⁻⁹ M	$k_{on}: 1,76 \times 10^6$ 1/Ms; $k_{off}: 2,84 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,16 x 10 ⁻⁹ M
H3 Completo (5) 8 x 2F1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 9,93 \times 10^5$ 1/Ms; $k_{off}: 2,71 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: 0,28 x 10 ⁻⁹ M

Fig. 35

SEQ ID NO:	CONSTRUCCIONES CDR-H3	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
25	PR1A3 CDR-H3	WDFYDYVEAMDY
33	5HFF12 CDR-H3	WDFAHYFQTMDY
34	5L1A10 CDR-H3	WDFAYYFQTMDY
217	PR1A3 (Y98A)	WDFADYVEAMDY
218	PR1A3 (D99Y)	WDFYYYVEAMDY
219	PR1A3 (D99H)	WDFYHYVEAMDY
220	PR1A3 (V101F)	WDFYDYFEAMDY
221	PR1A3 (E101aQ)	WDFYDYVQAMDY
222	PR1A3 (A103T)	WDFYDYVETMDY
223	PR1A3 (Y98A / D99Y)	WDFAYYVEAMDY
224	PR1A3 (W95Y)	YDFYDYVEAMDY

Fig. 36

SEQ. ID NO:	CONSTRUCCIÓN DE CADENA PESADA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
225	CH7A (Y98A)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTVSS
226	CH7A (D99Y)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
227	CH7A (D99H)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTVSS
228	CH7A (V101F)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTTVTVSS
229	CH7A (E102Q)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYVQAMDYWGQGTTVTVSS
230	CH7A (A103T)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYVETMDYWGQGTTVTVSS
231	CH7A (Y98A / D99Y)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFAYYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
232	CH7A (W95Y)	QQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGTTVTVSS
233	CH1A1A (Y98A)	QQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTVSS
234	CH1A1A (D99Y)	QQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTTEFGMNVWRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTTVTVSS

Fig. 37A

SEQ. ID NO:	CONSTRUCCIÓN DE CADENA PESADA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
235	CH1A1A (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFHYHVEAMDYWGQGGTTVTVSS
236	CH1A1A (V101F)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYFEAMDYWGQGGTTVTVSS
237	CH1A1A (E102Q)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVQAMDYWGQGGTTVTVSS
238	CH1A1A (A103T)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVETMDYWGQGGTTVTVSS
239	CH1A1A (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGGTTVTVSS
240	CH1A1B (W95Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGGTTVTVSS
241	CH1A1B (Y98A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGGTTVTVSS
242	CH1A1B (D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYHVEAMDYWGQGGTTVTVSS
243	CH1A1B (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFHYHVEAMDYWGQGGTTVTVSS
244	CH1A1B (V101F)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYFEAMDYWGQGGTTVTVSS

Fig. 37B

SEQ. ID NO:	CONSTRUCCIÓN DE CADENA PESADA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
245	CH1A1B (E102Q)	QVKLQSSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTEFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVQAMDYWGQGGTTVTVSS
246	CH1A1B (A103T)	QVKLQSSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTEFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVETMDYWGQGGTTVTVSS
247	CH1A1B (Y98A / D99Y)	QVKLQSSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTEFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGGTTVTVSS
248	CH1A1B (W95Y)	QVKLQSSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTEFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGGTTVTVSS
261	CH1A1A	QVQLVQSSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTEFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVEAMDYWGQGGTTVTVSS
262	CH1A1B	QVKLQSSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTEFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVEAMDYWGQGGTTVTVSS
263	CH1A1C	QVQLVQSSGPELKKPGASVKVSKKASGYTFTEFGMNVWRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFDYVEAMDYWGQGGTTVTVSS

Fig. 37C

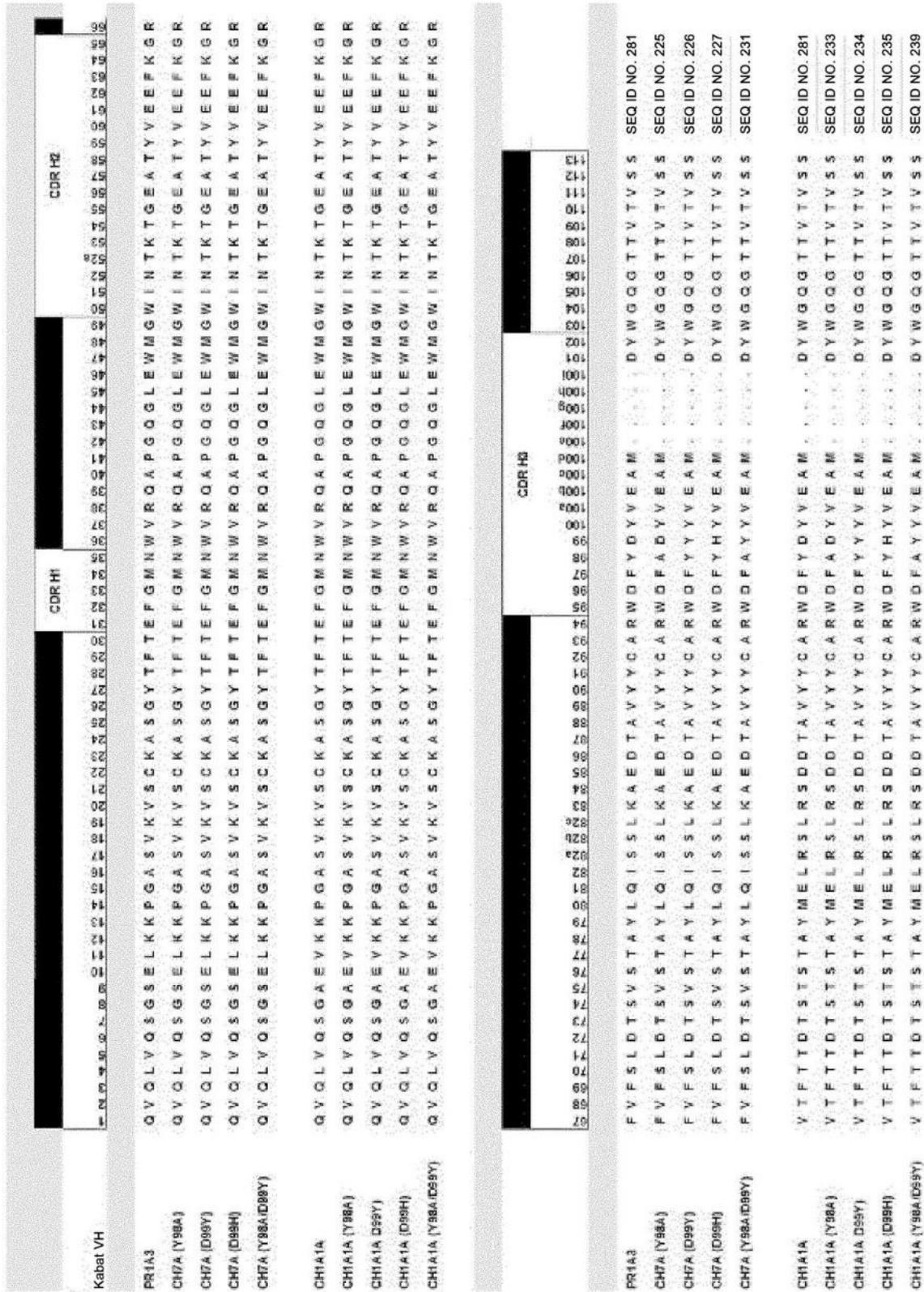


Fig. 38