

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 665**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2013 PCT/CA2013/000011**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13104050**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2013 E 13735811 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2802351**

54 Título: **Agentes para tratar cáncer de mama triple negativo**

30 Prioridad:

09.01.2012 US 201261584629 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2019

73 Titular/es:

**ADC THERAPEUTICS SA (100.0%)
Biopôle, Route de la Corniche 3B
1066 Epalinges, CH**

72 Inventor/es:

**TREMBLAY, GILLES, BERNARD;
MORAITIS, ANNA N. y
FILION, MARIO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 731 665 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

Agentes para tratar cáncer de mama triple negativo

5 **Antecedentes**

En todo el mundo, más de 1 millón de mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama cada año. El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea formada por docenas de tipos diferentes que se distinguen mediante un sistema de clasificación histológica. Un subtipo grande y la mayoría de los casos se identifican histológicamente como luminal A o luminal B, que se pueden caracterizar en gran medida como que exhiben la expresión del receptor de estrógeno (ER) con histología de bajo grado o mayor grado, respectivamente (Santana-Davila y Perez, 2010). Los métodos inmunohistoquímicos se utilizan para medir la expresión del receptor de progesterona (PgR) que, cuando se combina con el estado ER positivo, permite la clasificación de un tumor como sensible a hormonas. Además, la sobreexpresión o amplificación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) se puede controlar con inmunohistoquímica o con hibridación *in situ* fluorescente (FISH). En general, la expresión de estos tres marcadores en los tumores de mama se asocia con un mejor resultado clínico porque hay varias opciones de tratamiento disponibles para los pacientes que se dirigen a estas proteínas (de Ruijter et al., 2011), incluido el tamoxifeno, Arimidex™ (anastrozol), Aromasin™ (exemestano), Femara™ (letrozol), Faslodex™ (fulvestrant), Herceptin™ (trastuzumab) o Tykerb™ (lapatinib).

Otro subtipo histológico de cáncer de mama consiste en los cánceres de tipo basal que se asocian, entre otros, con un mayor grado histológico, un aumento del índice mitótico y una alta expresión de Ki67 (Santana-Davila y Perez, 2010). La gran mayoría de los cánceres de tipo basal están compuestos por casos de cáncer de mama triple negativo (TNBC por sus siglas en inglés), que constituyen entre el 15-20% de todos los casos diagnosticados de cáncer de mama (Ismail-Khan y Bui, 2010). El TNBC se define por la falta de expresión de proteína de ER, PgR y la ausencia de sobreexpresión de proteína HER2. La relación entre el cáncer de tipo basal y el TNBC no es fácil de delinear, ya que no todos los TNBC son de tipo basal y no todos los cánceres de tipo basal son TNBC, pero aproximadamente el 75% de los casos en estas categorías comparten características de ambos. TNBC se asocia con un mal pronóstico que consiste en bajas tasas de supervivencia a cinco años y alta recurrencia.

Los pacientes con TNBC desarrollan su enfermedad en una etapa más temprana de la vida en comparación con otros subtipos de cáncer de mama y, con frecuencia, se diagnostican en la etapa premenopáusica (Carey et al., 2006). El cáncer de mama triple negativo muestra una mayor propensión a la recurrencia después del tratamiento y parece ser más agresivo que otros subtipos de carcinoma de mama (Nofech-Mozes et al., 2009), similar a los del subtipo de cáncer de mama de tipo basal. Como consecuencia, la supervivencia general a cinco años de los pacientes con TNBC es significativamente más baja que los diagnosticados con otros subtipos de cáncer de mama. Actualmente no existe un marcador molecular específico aceptable para TNBC. A pesar de esta carencia, estos tumores responden a la quimioterapia (Kriege et al., 2009). Los pacientes han mostrado una mejor respuesta a los agentes citotóxicos en el entorno adyuvante, así como en el entorno neoadyuvante cuando se administran agentes como el 5-fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida (Rouzier et al. 2005). Otros agentes que han demostrado cierta eficacia incluyen compuestos basados en platino tal como cisplatino y compuestos antitubulina tales como taxanos (Santana-Davila y Perez, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, no hay dianas específicas para el TNBC, pero esto no ha impedido el ensayo de agentes diana, tales como la inhibición de la poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP1). PARP1 es una enzima que participa en la reparación de roturas de una sola hebra de ADN al asociarse con hebras de ADN dañadas y al mediar en el reclutamiento de enzimas necesarias para reparar roturas de una sola hebra (de Ruijter et al., 2011). Por lo tanto, la estrategia ha sido inhibir la actividad de PARP1 como un medio para permitir que las células cancerosas acumulen más roturas de una sola hebra de ADN, que en última instancia conduce a la inestabilidad genética, arresto mitótico y apoptosis. Se lograron resultados clínicos prometedores en pacientes que mostraban mutaciones en *BRCA1* y/o *BRCA2*, mediadores importantes del mantenimiento genético y recombinación homóloga requerida para la división celular adecuada. De hecho, los pacientes con mutaciones en *BRCA1*, que presumiblemente son deficientes en estas vías de estabilidad genética, mostraron una mayor respuesta a los inhibidores de PARP1 en comparación con aquellos que eran de tipo silvestre para *BRCA1* (Fong et al., 2009). Está claro que dirigirse a PARP1 en pacientes con TNBC que son portadores de la mutación en *BRCA* representa una estrategia prometedoras. La combinación del estado de ER/PgR/HER2 con el del perfil genético de los genes *BRCA1/2* podría ofrecer la mejor caracterización para decidir las opciones de tratamiento adecuadas para los pacientes con TNBC.

Otras estrategias también examinaron el uso de inhibidores de EGFR, ya sea como anticuerpos monoclonales o inhibidores de moléculas pequeñas o compuestos antiangiogénicos para dirigirse a VEGF. Varios ensayos clínicos han evaluado la eficacia de estos compuestos, pero ninguno de ellos ha mostrado una respuesta significativa cuando se administra solo. Sin embargo, se observó una leve eficacia en pacientes tratados con estos inhibidores en combinación con otros agentes citotóxicos (Santana-Davila y Pérez, 2010).

A pesar de los avances recientes en la comprensión y el tratamiento del cáncer de mama, el uso de la quimioterapia se asocia invariablemente con reacciones adversas graves, que limitan su uso. Como consecuencia, la necesidad de

estrategias más específicas, tales como la combinación de la especificidad de tejido del antígeno con la selectividad de los anticuerpos monoclonales, debería permitir una reducción significativa de los efectos secundarios inespecíficos asociados. No hay antígenos específicos de TNBC que se estén investigando actualmente como dianas terapéuticas para anticuerpos monoclonales. Por lo tanto, los pacientes con TNBC tienen pocas opciones debido a la incapacidad de dirigirse a un marcador específico de proteína que se expresa en estos tumores. Hay una necesidad urgente de identificar nuevas proteínas expresadas en TNBC para aplicaciones como nuevos marcadores de diagnóstico y nuevas terapias dirigidas.

El antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1), la secuencia de la proteína que se identifica en el presente documento como SEQ ID NO: 2, se clonó originalmente a partir de una biblioteca de ADNc derivada de una línea celular de carcinoma renal de antígeno leucocitario-B7 de histocompatibilidad como un péptido antigénico presentado a linfocitos T citotóxicos (Van den Eynde et al., 1999; número de acceso de Genbank Q9UBP8, la secuencia de ADNc está representada por los nucleótidos 738-992 de la SEQ ID NO: 1). Se encontró que el locus que contiene *KAAG1* codifica dos genes transcritos en ambas direcciones en cadenas opuestas. Se encontró que la cadena en sentido codifica un transcrito que codifica una proteína denominada DCDC2. Los estudios de expresión realizados por los presentes autores encontraron que el transcrito antisentido de *KAAG1* era específico de tumor y mostraba muy poca expresión en tejidos normales, mientras que el transcrito en sentido de DCDC2 se expresaba de forma ubicua (Van den Eynde et al., 1999). La expresión del transcrito de *KAAG1* en cáncer, y en particular en cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma se divulgó en la solicitud internacional número PCT/CA2007/001134 publicada el 27 de diciembre de 2007 con el número WO 2007/147265. Van den Eynde et al., también observaron expresión de ARN en carcinomas renales, carcinomas colorrectales, melanomas, sarcomas, leucemias, tumores cerebrales, tumores de tiroides, carcinomas mamarios, carcinomas de próstata, carcinomas esofágicos, tumor de vejiga, carcinomas pulmonares y tumores de cabeza y cuello. Recientemente, una fuerte evidencia genética obtenida a través de estudios de desequilibrio de unión encontró que el locus *VMP/DCDC2/KAAG1* estaba asociado con dislexia (Schumacher et al., 2006; Cope et al., 2005). Uno de estos informes señaló que el marcador *DCDC2* era el culpable en los pacientes disléxicos, ya que la función de esta proteína en la migración de las neuronas corticales estaba de acuerdo con los síntomas de estos pacientes que a menudo presentan una migración y maduración neuronal anormal (Schumacher et al., 2006).

El presente solicitante ha obtenido un panel de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se unen a la proteína KAAG1. Se demostró que estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se dirigen a tres regiones de la proteína; los aminoácidos 1 a 35, los aminoácidos 36 a 60 y los aminoácidos 61 a 84. El presente solicitante encontró que los anticuerpos dirigidos a una región entre los aminoácidos 30 a 84 fueron los más ventajosos para fines terapéuticos, ya que reconocieron KAAG1 ubicado en la superficie de las células tumorales. El presente solicitante ha demostrado que algunos de estos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y/o son internalizados por células tumorales, lo que los hace buenos candidatos para suministrar una carga útil a células tumorales. El presente solicitante también ha generado anticuerpos quiméricos y humanizados basados en candidatos de anticuerpos seleccionados y ha demostrado que estos anticuerpos pueden inhibir la invasión y la formación de células tumorales (véase PCT/CA2009/001586 publicado el 3 de junio de 2010 con el número WO2010/060186 y PCT/CA2010/001785 publicado el 12 de mayo de 2011 con el número WO2011/054112). El documento US 2011/0223107 también describe anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a KAAG1. Por último, el presente solicitante encontró que estos anticuerpos podrían usarse para el tratamiento y diagnóstico de cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer renal, cáncer colorrectal, sarcoma, leucemia, tumor cerebral, tumores de tiroides, cáncer de mama, cáncer de próstata, tumor esofágico, tumor de vejiga, tumor pulmonar y tumor de cabeza y cuello y la forma metastásica de estos cánceres.

El presente solicitante ha llegado al inesperado descubrimiento de que las células de cáncer de mama que carecen de la expresión de la proteína ER, la expresión de la proteína PgR y/o que muestran ausencia de sobreexpresión de la proteína HER2 (es decir, células de cáncer de mama triple negativas, de tipo basal) pueden marcarse de manera eficiente con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a KAAG1. Los anticuerpos anti-KAAG1 se pueden usar, por lo tanto, para la detección y el tratamiento terapéutico de las células de cáncer de mama que son negativas para al menos uno de estos marcadores.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1a** es una alineación de secuencias de aminoácidos de los dominios variables 3A4 de las cadenas ligeras murinas y humanizadas. La cadena ligera tiene dos variantes humanizadas (Lh1 y Lh2). Las CDR se muestran en negrita e indican por CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Las mutaciones inversas en las regiones marco humanas que son aminoácidos murinos están subrayadas en las secuencias humanizadas.

La **Figura 1b** es una alineación de secuencias de aminoácidos de los dominios variables 3A4 de las cadenas pesadas murinas y humanizadas. La cadena pesada tiene cuatro variantes humanizadas (Hh1 y Hh4). Las CDR se muestran en negrita e indican por CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Las mutaciones inversas en las regiones marco humanas que son aminoácidos murinos están subrayadas en las secuencias humanizadas.

La **Figura 2a** es una alineación de la región variable de la cadena ligera 3A4 murina (SEQ ID NO:4) con una

variante de la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO:189) utilizando el programa ClustalW2 (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW y ClustalX versión 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948J donde un "*" (asterisco) indica las posiciones que tienen un único resto totalmente conservado, en donde "." (dos puntos) indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares, puntuación > 0,5 en la matriz Gonnet PAM 250 y donde "." (período) indica la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares: puntuación = <0,5 en la matriz Gonnet PAM 250.

La **Figura 2b** es una alineación de la región variable de la cadena pesada 3A4 murina (SEQ ID NO:2) con una variante de la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO:194) utilizando el programa ClustalW2 (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW y ClustalX versión 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948J donde un "*" (asterisco) indica las posiciones que tienen un único resto totalmente conservado, en donde "." (dos puntos) indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares, puntuación > 0,5 en la matriz Gonnet PAM 250 y donde "." (período) indica la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares: puntuación = <0,5 en la matriz Gonnet PAM 250.

La **Figura 3a** representa el mapa de plásmido de pKCR5-3A4-HC-Variante 1. Las cadenas pesadas de las variantes de 3A4 humanizadas se clonaron de la misma manera en el sitio *HindIII* de pK-CR5. En consecuencia, los plásmidos resultantes son idénticos a pKCR5-3A4-HC-variante 1, excepto por la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada.

La **Figura 3b** representa el mapa de plásmido de pMPG-CR5-3A4-LC-Variante 1. Las cadenas ligeras de las variantes humanizadas 1 y 2 del anticuerpo 3A4 se clonaron de la misma manera en el sitio BamHI de pMPG-CR5. Como consecuencia, el plásmido resultante es idéntico a pMPG-CR5-3A4-LC-Variante 1, a excepción de la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera.

La **Figura 4** representa un análisis de la producción de anticuerpos después de la transfección transitoria en células CHO. El sobrenadante (13 días después de la transfección) de células CHOcTA transfectadas con las diferentes combinaciones de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo 3A4 humanizado se analizó mediante transferencia Western. La cuantificación del anticuerpo producido en los sobrenadantes se determinó después de explorar las bandas de la transferencia Western contra la dilución de un patrón conocido (anticuerpo IgG humano purificado). Marcador de peso molecular Mr (kDa).

La **Figura 5** es un gráfico de una filtración en gel Superdex G75 de una muestra de KAAG1 recombinante. KAAG1 se inyectó sobre la filtración en gel y se separó a 0,4 ml/min. El máximo más grande entre las fracciones 15 - 19.

La **Figura 6** es una Tabla que enumera las constantes de velocidad y afinidad para las variantes murinas y humanizadas del anticuerpo 3A4.

La **Figura 7a** es un histograma que ilustra las tasas de asociación (K_a) de los anticuerpos humanizados.

La **Figura 7b** es un histograma que ilustra las tasas de disociación (K_d) de los anticuerpos humanizados.

La **Figura 7c** es un histograma que ilustra las constantes de afinidad (K_D) de los anticuerpos humanizados.

La **Figura 8a** ilustra variantes de 3A4 humanizadas que se unen a KAAG1 en un ELISA. Esta figura muestra la unión comparativa de las variantes del anticuerpo humanizado 3A4 y el 3A4 murino. Perfiles de unión dependientes de la concentración de las cadenas pesadas humanizadas (Hh1, Hh2, Hh3 y Hh4) ensamblados con la variante de cadena ligera Lh1.

La **Figura 8b** ilustra variantes de 3A4 humanizadas que se unen a KAAG1 en un ELISA. Esta figura muestra la unión comparativa de las variantes del anticuerpo humanizado 3A4 y el 3A4 murino. Perfiles de unión dependientes de la concentración de las cadenas pesadas humanizadas (Hh1, Hh2, Hh3 y Hh4) ensamblados con la variante de cadena ligera Lh2.

La **Figura 9** ilustra variantes de 3A4 humanizadas que se unen a KAAG1 en la superficie de las células cancerosas. Esta ilustración muestra la actividad de unión comparativa de los anticuerpos 3A4 humanizados y murinos en las células de cáncer de ovario SKOV-3 no permeables.

La **Figura 10** muestra una exploración de una micromatriz de tejido que contiene 139 muestras de biopsia obtenidas de pacientes con cáncer de mama. Las muestras se transfirieron con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1 y mostraron que la gran mayoría de los tumores de mama expresaban un nivel muy alto de antígeno KAAG1. Las muestras confirmadas de TNBC están marcadas con un *asterisco*.

La **Figura 11** muestra los resultados de la citometría de flujo realizada utilizando las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT- 20, BT-549, T47D, MCF-7 y 293-6E incubadas con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1 (barras azules del histograma) en comparación con una IgG de control (barras rojas). Este es un resultado

representativo de un experimento que se realizó por triplicado. Las líneas celulares de TNBC están marcadas con un *asterisco*.

5 La **Figura 12** representa la detección del antígeno KAAG1 en la superficie de las células MDA-MB-231 mediante citometría de flujo con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1. La señal de fluorescencia disminuye con el tiempo cuando las células se incubaron a 37 °C, lo que sugiere que el complejo KAAG1/anticuerpo se internalizó durante la incubación cuando las células se incubaron con 3A4.

10 La **Figura 13** representa la detección del antígeno KAAG1 en la superficie de las células MDA-MB-436 mediante citometría de flujo con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1. La señal de fluorescencia disminuye con el tiempo cuando las células se incubaron a 37 °C, lo que sugiere que el complejo KAAG1/anticuerpo se internalizó durante la incubación cuando las células se incubaron con 3A4.

15 La **Figura 14** representa la detección del antígeno KAAG1 en la superficie de las células BT-20 mediante citometría de flujo con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1. La señal de fluorescencia disminuye con el tiempo cuando las células se incubaron a 37 °C, lo que sugiere que el complejo KAAG1/anticuerpo se internalizó durante la incubación cuando las células se incubaron con 3A4.

20 La **Figura 15** representa la detección del antígeno KAAG1 en la superficie de las células T47D mediante citometría de flujo con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1. La señal de fluorescencia disminuye con el tiempo cuando las células se incubaron a 37 °C, lo que sugiere que el complejo KAAG1/anticuerpo se internalizó durante la incubación cuando las células se incubaron con 3A4.

25 La **Figura 16** representa los datos de inmunofluorescencia realizados en células MDA-MB-231 vivas con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1 y el anticuerpo anti-LAMP1. La señal de inmunofluorescencia asociada con el anticuerpo anti-KAAG1 se muestra en el panel izquierdo, la señal de inmunofluorescencia asociada a LAMP1 se muestra en el panel central y la unión de ambas imágenes se muestra en el panel derecho. Estos datos ilustran la colocalización de KAAG1 y LAMP1 cerca del área perinuclear.

30 La **Figura 17** representa los datos de inmunofluorescencia realizados en células MDA-MB-231 vivas con el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1 y el anticuerpo anti-LAMP1. La señal de inmunofluorescencia asociada con el anticuerpo anti-KAAG1 se muestra en el panel izquierdo, la señal de inmunofluorescencia asociada a LAMP1 se muestra en el panel central y la unión de ambas imágenes se muestra en el panel derecho. Estos datos ilustran la localización de KAAG1 con LAMP1, un marcador de endosomas/lisomas tardíos.

35 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse específicamente al antígeno 1 asociado al Riñón (KAAG1) y se conjuga con un resto terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una CDRH1 como se establece en la SEQ ID NO: 49, una CDRH2 como se establece en la SEQ ID NO:50 o en la SEQ ID NO:212, una CDRH3 como se establece en la SEQ ID NO:51, una CDRL1 como se establece en la SEQ ID NO: 52, una CDRL2 como se establece en la SEQ ID NO:53 y una CDRL3 como se establece en la SEQ ID NO: 54.

45 Las realizaciones preferidas de la invención se exponen en las reivindicaciones.

En el presente documento se divulga un método para tratar o detectar cáncer o células cancerosas (*in vitro* o *in vivo*) en un individuo que lo necesite.

50 En conformidad con la presente invención, el tratamiento se lleva a cabo con un anticuerpo capaz de unirse a KAAG1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se conjuga con un resto terapéutico.

El individuo que lo necesita puede comprender, por ejemplo, un individuo que tiene o se sospecha que tiene cáncer. Tal individuo puede tener un cáncer o células cancerosas que se originan a partir de un carcinoma de mama.

El cáncer o las células cancerosas pueden originarse más particularmente a partir de un carcinoma de mama caracterizado por ser triple negativo o de tipo basal.

60 Por lo tanto, los individuos que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento o detección descritos en el presente documento pueden incluir a quienes padecen carcinoma de mama.

El carcinoma de mama puede comprender células tumorales que muestran una disminución o una pérdida en la expresión del receptor de estrógeno.

65 El carcinoma de mama puede comprender células tumorales que muestran una disminución o una pérdida en la

expresión del receptor de progesterona.

El carcinoma de mama puede comprender células tumorales que muestran una disminución o una pérdida en la expresión de Her2.

5 El carcinoma de mama puede comprender células tumorales que muestran una disminución o una pérdida en la sobreexpresión de Her2.

10 Más particularmente, el carcinoma de mama puede comprender células tumorales que muestran 1) una disminución o una pérdida en la expresión del receptor de estrógeno y el receptor de progesterona, 2) una disminución o una pérdida en la expresión del receptor de estrógeno y una disminución o una pérdida de la sobreexpresión de Her2, 3) una disminución o una pérdida en la expresión del receptor de progesterona y una disminución o una pérdida de la sobreexpresión de Her2 o 4) una disminución o una pérdida en la expresión del receptor de estrógeno, una disminución o una pérdida en la expresión del receptor de progesterona y una disminución o pérdida de la sobreexpresión de Her2.

15 Aún más particularmente, el carcinoma de mama puede comprender células tumorales que muestran 1) una pérdida en la expresión del receptor de estrógeno y el receptor de progesterona, 2) una pérdida en la expresión del receptor de estrógeno y una pérdida de la expresión de Her2, 3) una pérdida en la expresión del receptor de progesterona y una pérdida de la expresión de Her2 o 4) una pérdida en la expresión del receptor de estrógeno, una pérdida en la expresión del receptor de progesterona y una pérdida de la expresión de Her2.

En conformidad con la presente invención, el individuo puede portar células de cáncer de mama que se caracterizan por ser triple negativas o pueden tener un tumor clasificado como cáncer de mama triple negativo.

25 En conformidad con la presente invención, el individuo puede portar células de cáncer de mama que se caracterizan por ser de tipo basal, o pueden tener un tumor clasificado como cáncer de mama de tipo basal.

Otros individuos que se beneficiarían del tratamiento con un anti-KAAG1 incluyen aquellos que tienen carcinoma que comprende células tumorales que muestran un fenotipo de transición epitelial a mesenquimal (EMT).

30 Los marcadores moleculares de EMT comúnmente utilizados incluyen, por ejemplo, una expresión reducida de E-cadherina, citoqueratina y β -catenina (en la membrana) y/o una expresión aumentada de Snail, Slug, Twist, ZEB1, ZEB2, N-cadherina, vimentina, α actina de músculo liso, metaloproteinasas de la matriz, etc. (véase, por ejemplo, Kalluri y Weinberg, *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), p1420-1428; 2009; Fassina et al., *Modern Pathology*, 25; p86-99; 2012; Lee et al., *JCB*; 172; p973-981; 2006). Un fenotipo EMT también puede distinguirse por una capacidad aumentada de migración, invasión de, por resistencia a anoikis/apoptosis. Las células que se encuentran en transición epitelial a mesenquimal pueden ser detectadas por una reducción de los marcadores epiteliales y la aparición de marcadores mesenquimales o fenotipos EMT.

40 En conformidad con la presente invención, por lo tanto, el uso terapéutico puede comprender, por ejemplo, administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que sea capaz de unirse específicamente a KAAG1 a un individuo que lo necesite. El individuo que lo necesita se selecciona preferentemente basándose en su tumor que carece de expresión de ER, expresión de PgR y/o ausencia de sobreexpresión de la proteína HER2. Las pruebas clínicas para estos marcadores se realizan generalmente utilizando métodos histopatológicos (inmunohistoquímica, FISH, etc.) y/o estudios de expresión génica (véase, por ejemplo, Dent et al, 2007, Bernstein y Lacey, 2011). El individuo que lo necesita puede ser un individuo que ha recibido un diagnóstico de cáncer de mama triple negativo o cáncer de mama de tipo basal. El individuo que lo necesita puede ser un individuo que no responde a la terapia hormonal y/o a la terapia con transtuzumab (u otros anticuerpos anti-Her2). De manera alternativa, el individuo que lo necesita puede ser un individuo portador de células tumorales que tengan la capacidad de experimentar una transición epitelial a mesenquimal o que hayan adquirido un fenotipo mesenquimal.

En el presente documento se divulga un método para tratar cáncer de mama triple negativo o cáncer de mama de tipo basal mediante la administración de un inhibidor de la actividad o expresión de KAAG1 a un individuo que lo necesite.

55 De acuerdo con la presente divulgación, el inhibidor de KAAG1 puede comprender, por lo tanto, un anticuerpo descrito en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

También de acuerdo con la presente divulgación, el inhibidor de KAAG1 puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma. Más particularmente, el inhibidor de KAAG1 puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a los nucleótidos 738 a 992 (inclusive) de la SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma. Por ejemplo, el inhibidor puede incluir al menos 10 nucleótidos consecutivos (al menos 15, al menos 20) que sean complementarios de la SEQ ID NO: 1 o de los nucleótidos 738 a 992 (inclusive) de la SEQ ID NO: 1. Un tipo más particular de inhibidor de KAAG1 incluye un ARNip que inhibe la expresión de la SEQ ID NO: 1.

65 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno adecuados incluyen aquellos que son capaces de unirse a KAAG1

en la superficie de las células tumorales. Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse preferentemente a un epítipo incluido dentro de los aminoácidos 30 a 84 de KAAG1, inclusive.

5 De manera alternativa, tales anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse a un epítipo localizado dentro de los aminoácidos 36 a 60 (inclusive) o dentro de los aminoácidos 61 a 84 (inclusive) de KAAG1.

10 El epítipo puede estar particularmente localizado o comprendido dentro de los aminoácidos 50 a 70, 50 a 65, 51 a 65, 52 a 65, 53 a 65, 54 a 65, 54 a 64, 54 a 63, 54 a 62, 54 a 61, 54 a 60, 50 a 62; 50 a 61, o 50 a 60 (inclusive o exclusivamente).

De acuerdo con una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a un epítipo comprendido dentro de los aminoácidos 50 a 70 de KAAG1.

15 En una realización adicional de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a un epítipo comprendido dentro de los aminoácidos 50 a 62 de KAAG1.

Aún en otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a un epítipo comprendido dentro de los aminoácidos 54 a 65 de KAAG1.

20 Los anticuerpos adecuados para el tratamiento terapéutico incluyen, por ejemplo, aquellos que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

25 Otros anticuerpos aún más adecuados para el tratamiento terapéutico incluyen aquellos que están conjugados con un resto terapéutico.

En conformidad con la presente invención, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

30 Descripción detallada de la invención

Uso terapéutico

35 Como se indica en el presente documento, la presente invención abarca la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un individuo que tiene un cáncer de mama caracterizado por ser "cáncer de mama triple negativo". El cáncer de mama puede ser "cáncer de mama de tipo basal".

40 La clasificación de los subtipos de cáncer de mama como SON "cáncer de mama triple negativo" o "cáncer de mama de tipo basal" se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Foulkes et al., N. Engl. J. Med., 2010; 363:1938-1948) e incluye, por ejemplo, las siguientes definiciones:

45 "cáncer de mama de tipo basal", puede incluir, por ejemplo, un subtipo de cáncer de mama que comprende un grupo heterogéneo de tumores caracterizados por la ausencia o bajos niveles de expresión de los receptores de estrógeno, muy baja prevalencia de sobreexpresión de Her2 y expresión de genes que se encuentran generalmente en las células basales o mioepiteliales de la mama humana. Dicha expresión se puede determinar mediante análisis de micromatrices.

50 "Cáncer de mama triple-negativo", puede incluir, por ejemplo, un tumor caracterizado por la falta de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y expresión de Her2. Algunos investigadores aceptan tumores como que son negativos para la expresión de ER o PR solo si menos del 1% de las células son positivas para la expresión de ER o PR; otros consideran que los tumores son negativos para la expresión de ER o PR cuando hasta el 10% de las células son positivas para la expresión. Se han utilizado diferentes definiciones de negatividad para HER2. Los dos adoptados con mayor frecuencia incluyen tumores con puntuaciones inmunohistoquímicas de 0/1 + o 2+ que carecen de la amplificación del gen HER2 después de hibridación *in situ*. Tal expresión se puede determinar especialmente mediante tinción inmunohistoquímica.

55 En el presente documento se divulga un método de tratamiento que incluye administrar un inhibidor de KAAG1 a un individuo que lo necesite. Dicho inhibidor de KAAG1 incluye, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a KAAG1.

60 Es probable que los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno más potentes sean los que tienen una alta afinidad por KAAG1. También es probable que los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno más potentes puedan ser aquellos que están internalizados dentro de un compartimiento de células tal como, por ejemplo, un lisosoma o un endosoma.

65 Como tales, la presente invención abarca especialmente anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen una alta afinidad por KAAG1.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno adecuados incluyen aquellos que son capaces de unirse a KAAG1 en la superficie de las células tumorales con una alta afinidad. Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de alta afinidad pueden unirse preferentemente a un epítipo incluido dentro de los aminoácidos 30 a 84 de KAAG1, inclusive.

5 De manera alternativa, tales anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de alta afinidad pueden unirse a un epítipo localizado dentro de los aminoácidos 36 a 60 (inclusive) o dentro de los aminoácidos 61 a 84 (inclusive) de KAAG1.

10 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de alta afinidad pueden unirse, por ejemplo, a un epítipo que puede estar particularmente localizado o comprendido dentro de los aminoácidos 50 a 70, 50 a 65, 51 a 65, 52 a 65, 53 a 65, 54 a 65, 54 a 64, 54 a 63, 54 a 62, 54 a 61, 54 a 60, 50 a 62; 50 a 61, o 50 a 60 (inclusive o exclusivamente).

15 De acuerdo con una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de alta afinidad puede unirse a un epítipo comprendido dentro de los aminoácidos 50 a 70 de KAAG1.

En una realización adicional de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de alta afinidad puede unirse a un epítipo comprendido dentro de los aminoácidos 50 a 62 de KAAG1.

20 Aún en otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de alta afinidad puede unirse a un epítipo comprendido dentro de los aminoácidos 54 a 65 de KAAG1.

25 Los anticuerpos preferidos que incluyen anticuerpos de alta afinidad son aquellos que pueden internalizarse en una célula o compartimento celular (por ejemplo, lisosomas o endosomas). La capacidad de los anticuerpos para internalizarse puede determinarse mediante un método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, y sin limitación, mediante estudios de inmunofluorescencia similares a los realizados en el presente documento.

30 La presente invención se refiere a anticuerpos que tienen CDR idénticas a las del 3A4. Como tales, la presente invención abarca los anticuerpos que tienen una región variable de cadena ligera y/o secuencias consenso de región variable de cadena pesada establecidas en cualquiera de las SEQ ID NO: 186 a 188 y 191 a 193 y las secuencias específicas establecidas en las SEQ ID NO: 46, 48, 189, 190, o 194 a 198. Entre estos, se contemplan particularmente los anticuerpos que tienen una región variable de cadena ligera y/o secuencias consenso de región variable de cadena pesada establecidas en cualquiera de las SEQ ID NO: 188 y 196 o secuencias específicas establecidas en las SEQ ID NO: 46, 48, 189, 190 o 194 a 198.

35 De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se conjugan con un resto terapéutico.

40 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden tener una región constante humana. Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden tener una región constante de IgG1 humana. De manera alternativa, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden tener una región constante de IgG2 humana.

45 El anticuerpo para su uso de la presente invención también puede incluir la administración de un anticuerpo de KAAG1 conjugado con un resto terapéutico o fragmento de unión a antígeno conjugado con un resto terapéutico en combinación con un agente anticanceroso tal como, por ejemplo, fármaco de molécula pequeña, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a una diana distinta de KAAG1, un agente quimioterapéutico o un agente citotóxico. El ejemplo de agente anticancerígeno que podría administrarse con el anticuerpo de KAAG1 puede incluir, por ejemplo, doxorubicina, taxanos, agentes antiangiogénicos, sales de platino, inhibidores de PARP.

50 Otros métodos de tratamiento divulgados en el presente documento incluyen administrar otros tipos de inhibidores de KAAG1, tales como terapias basadas en antisentido (ARNip, antisentido, ribozimas, etc.).

Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se unen a KAAG1

55 La expresión "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno" o expresiones similares tales como "anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno" abarca, por ejemplo, "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno variante", tal como, por ejemplo, "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado".

60 El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpo intacto, anticuerpos monoclonales o policlonales. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos humanos suelen estar formados por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden regiones variables y regiones constantes. La región variable de cadena ligera comprende 3 CDR, identificadas, en el presente documento, como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 flanqueadas por regiones marco. La región variable de cadena pesada comprende 3 CDR, identificadas, en el presente documento, como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 flanqueadas por regiones marco.

65

La expresión "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a un antígeno (por ejemplo, KAAG1, forma secretada de KAAG1 o variantes del mismo). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR), por ejemplo, V_H CDR3. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite conformar una sola cadena polipeptídica en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarias (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Estos anticuerpos de cadena sencilla también se pretenden que entren dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de dominio de unión de inmunoglobulina que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o una región variable de cadena pesada fusionada a una región variable de cadena ligera a través de un péptido enlazador) que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. La región bisagra puede modificarse reemplazando uno o más restos de cisteína con restos de serina para evitar la dimerización. Dichas proteínas de fusión de dominio de unión de inmunoglobulina se divulgan adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la materia y se seleccionan en función de su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Un sitio de unión a antígeno típico comprende las regiones variables formadas por el emparejamiento de una inmunoglobulina de cadena ligera y una inmunoglobulina de cadena pesada. La estructura de las regiones variables del anticuerpo es muy consistente y muestra estructuras muy similares. Estas regiones variables están compuestas normalmente por regiones marco relativamente homólogas (FR) interpuestas con tres regiones hipervariables denominadas Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR). Con frecuencia, la actividad de unión global del fragmento de unión a antígeno está dictada por la secuencia de las CDR. Los FR a menudo desempeñan un papel en el posicionamiento y la alineación adecuados en tres dimensiones de las CDR para la unión óptima del antígeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alta afinidad" se refiere a una afinidad de 10 nM o menos. La expresión "alta afinidad" incluye especialmente anticuerpos que tienen una afinidad de 5 nM o menos. La expresión "alta afinidad" incluye, aún más particularmente, anticuerpos que tienen una afinidad de 1 nM o menos o 0,1 nM o menos.

Los anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden originarse, por ejemplo, a partir de un ratón, una rata o cualquier otro mamífero o de otras fuentes, tal como a través de tecnologías de ADN recombinante.

Los anticuerpos anti-KAAG1 se aislaron inicialmente de bibliotecas Fab por su especificidad hacia el antígeno de interés. En el presente documento se proporcionan métodos a modo de ejemplo sobre cómo convertir Fab en inmunoglobulinas completas.

Las regiones variables descritas en el presente documento pueden fusionarse con regiones constantes de una especie deseada, permitiendo así el reconocimiento del anticuerpo por células efectoras de la especie deseada. La región constante se puede originar, por ejemplo, a partir de un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La clonación o la síntesis de una región constante en un marco con una región variable está dentro del alcance de un experto en la materia y puede realizarse, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante.

En determinadas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos que se unen a KAAG1 pueden ser del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las realizaciones más específicas de la invención se refieren a un anticuerpo del subtipo IgG1 o especialmente del subtipo IgG1 humano. Otras realizaciones específicas de la invención se refieren a un anticuerpo del subtipo IgG2 o especialmente del subtipo IgG2 humano.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado del subtipo de subtipo IgG1 o especialmente el subtipo IgG1 humano. De manera alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado del subtipo IgG2 o especialmente del subtipo IgG2 humano.

El anticuerpo puede ser, por ejemplo, biológicamente activo en la mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad mediada por el complemento (CMC) o estar asociado con complejos inmunitarios. La ADCC típica implica la activación de linfocitos citolíticos naturales (NK) y depende del reconocimiento de las células

recubiertas de anticuerpos por los receptores Fc en la superficie de los linfocitos NK. Los receptores Fc reconocen el dominio Fc de anticuerpos como el que está presente en IgG1, que se une a la superficie de una célula diana, en particular una célula cancerosa que expresa un antígeno, tal como KAAG1. Una vez que se une al receptor Fc de IgG, el linfocito NK libera citoquinas y gránulos citotóxicos que ingresan a la célula diana y promueven la muerte celular al desencadenar la apoptosis.

En el presente documento se describe una colección de anticuerpos que se unen a KAAG1 o a una variante de KAAG1. En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden seleccionarse a partir del grupo que consiste en un anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales tales como anticuerpos quiméricos o humanizados, fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio y polipéptidos con una región de unión a antígeno.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado de la presente invención puede ser capaz de inducir la muerte (eliminación, destrucción, lisis) de células tumorales que expresan KAAG1 o células tumorales que expresan variante de KAAG1 (por ejemplo, de una manera dependiente de ADCC).

En otro aspecto adicional de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado de la presente invención se puede caracterizar especialmente por su capacidad de reducir la propagación de células tumorales que expresan KAAG1 o una variante de KAAG1.

En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado de la presente invención se puede caracterizar por su capacidad de disminuir o alterar la formación de tumores que expresan KAAG1 o una variante de KAAG1.

En una realización a modo de ejemplo de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado puede comprender aminoácidos de una región constante, que pueden originarse, por ejemplo, a partir de un anticuerpo humano.

En otra realización a modo de ejemplo de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado puede comprender aminoácidos de una región marco de un anticuerpo humano.

El presente solicitante ha generado anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno específicos que pueden ser útiles para los fines descritos en el presente documento.

La siguiente es una lista de los anticuerpos que se generaron y se demostró que se unen de manera específica a KAAG1; 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 y 3H3. Las secuencias de la cadena ligera o pesada del anticuerpo, las regiones variables o las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están disponibles en la solicitud internacional número PCT/CA2009/001586 publicada el 3 de junio de 2010 con el número WO2010/060186A8, en la solicitud internacional número PCT/CA2010/001795 publicada el 12 de mayo de 2011 con el número WO2011/054112A1 o en la solicitud internacional número PCT/CA2012/000296 publicada el 4 de octubre de 2012 con el número WO2012/129668A1.

En la mayoría de los casos, la secuencia de las CDR se ha proporcionado por separado o se muestra en negrita en el presente documento.

Entre estos anticuerpos, el 3D3, 3A4, 3G10 y 3C4 se seleccionaron para pruebas biológicas *in vitro* y/o *in vivo*. El anticuerpo 3A4 parecía tener las mejores características. Basándose en los experimentos de los presentes inventores, el anticuerpo 3A4 cuando está conjugado con un resto terapéutico (por ejemplo, un agente citotóxico) es más eficaz para matar células cancerosas que su versión no conjugada.

En una divulgación a modo de ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender cualquier CDR individual o una combinación de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la región variable de cadena ligera. La CDR3 se puede seleccionar más particularmente. La combinación puede incluir, por ejemplo, CDRL1 y CDRL3; CDRL1 y CDRL2; CDRL2 y CDRL3 y; CDRL1, CDRL2 y CDRL3.

En otra divulgación a modo de ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender cualquier CDR individual o una combinación de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la región variable de cadena pesada. La CDR3 se puede seleccionar más particularmente. La combinación puede incluir, por ejemplo, CDRH1 y CDRH3; CDRH1 y CDRH2; CDRH2 y CDRH3 y; CDRH1, CDRH2 y CDRH3.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender al menos dos CDR de una CDRL1, una CDRL2 o una CDRL3.

También de acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden comprender una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3.

Además, de acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden comprender:

- 5 a. Al menos dos CDR de una CDRL1, CDRL2 o CDRL3 y;
 a. Al menos dos CDR de una CDRH1, una CDRH2 o una CDRH3.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden comprender más preferentemente una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3.

- 10 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden también comprender más preferentemente una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3.

15 Cuando solo está disponible una de la región variable de cadena ligera o de la región variable de cadena pesada, se puede reconstituir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno mediante la selección de una biblioteca de regiones variables complementarias utilizando métodos conocidos en la técnica (Portolano et al. The Journal of Immunology (1993) 150: 880-887, Clarkson et al., Nature (1991) 352:624-628).

20 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno a modo de ejemplo son aquellos que tienen las CDR de la cadena ligera y/o cadenas pesadas de los anticuerpos 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 o 3H3. Los ejemplos más particulares incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen las CDR de cadena ligera y/o cadenas pesadas de los anticuerpos 3D3, 3A4, 3C4 o 3G10. En conformidad con la presente invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno tienen las CDR de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo 3A4. La invención abarcó así cualquier anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado que comprende las CDR del anticuerpo 3A4.

25 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se pueden usar de acuerdo con la presente invención son aquellos que tienen CDR del anticuerpo 3A4 y comprenden, por ejemplo, una CDRH1 como se establece en la SEQ ID NO:49, una CDRH2 como se establece en la SEQ ID NO:50 o en la SEQ ID NO:212, una CDRH3 como se establece en la SEQ ID NO:51, una CDRL1 como se establece en la SEQ ID NO: 52, una CDRL2 como se establece en la SEQ ID NO:53 y una CDRL3 como se establece en la SEQ ID NO: 54.

La presente invención abarca, por lo tanto, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que son capaces de unirse específicamente a KAAG1 y que pueden comprender secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- 35 d. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 48 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 46;
 aa. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,
 40 bb. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,
 cc. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 196,
 45 dd. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 197,
 ee. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,
 ff. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,
 50 gg. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 196,
 hh. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 197.

55 En el presente documento se divulgan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que son capaces de unirse específicamente a KAAG1 y que pueden comprender secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- 60 a. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 16 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 18,
 b. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 20 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 22;
 c. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 24 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 26;
 d. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 48 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 46;
 65 e. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 103 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 126,

- f. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 104 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 127,
- g. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 105 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 128,
- 5 h. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 106 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 145,
- i. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 107 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 129,
- 10 j. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 108 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 130,
- k. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 109 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 141,
- l. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 110 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 131,
- 15 m. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 111 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 134,
- n. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 112 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 135,
- 20 o. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 113 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 136,
- p. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 114 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 133,
- q. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 115 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 140,
- 25 r. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 116 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 137,
- s. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 117 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 144,
- 30 t. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 118 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 139,
- u. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 119 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 132,
- v. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 120 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 142,
- 35 w. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 121 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 138,
- x. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 122 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 146,
- y. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 123 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 153,
- 40 z. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 124 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 143,
- aa. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,
- 45 bb. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,
- cc. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 196,
- 50 dd. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 197,
- ee. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,
- ff. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,
- 55 gg. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 196, o
- hh. las 3CDR de una región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o las 3CDR de una región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 197.
- 60 Otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno a modo de ejemplo tienen la cadena ligera y/o las cadenas pesadas de los anticuerpos 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 o 3H3. Los ejemplos más particulares incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen la cadena ligera y/o las cadenas pesadas de los anticuerpos 3D3, 3A4, 3C4 o 3G10. Incluso realizaciones más particulares de la invención incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen la cadena ligera y/o las cadenas pesadas del anticuerpo 3A4 (humanizado y no humanizado).
- 65

La presente invención abarca, por lo tanto, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que son capaces de unirse específicamente a KAAG1 y que pueden comprender secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- 5 d. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 48 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 46,
- aa. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,
- bb. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,
- 10 cc. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,
- dd. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,
- 15 ee. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 196, o
- ff. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 197.

20 En el presente documento se divulgan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que son capaces de unirse específicamente a KAAG1 y que pueden comprender secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- a. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 16 (codificada por la SEQ ID NO: 15) y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 18 (codificada por la SEQ ID NO: 17),
- 25 b. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 20 (codificada por la SEQ ID NO: 19) y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 22 (codificada por la SEQ ID NO: 21);
- c. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 24 (codificada por la SEQ ID NO: 23) y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 26 (codificada por la SEQ ID NO: 25);
- d. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 48 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 46,
- 30 e. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 103 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 126,
- f. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 104 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 127,
- 35 g. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 105 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 128,
- h. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 106 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 145,
- i. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 107 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 129,
- 40 j. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 108 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 130,
- k. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 109 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 141,
- 45 l. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 110 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 131,
- m. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 111 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 134,
- n. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 112 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 135,
- 50 o. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 113 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 140,
- p. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 114 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 133,
- 55 q. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 115 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 140,
- r. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 116 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 137,
- s. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 117 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 144,
- 60 t. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 118 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 139,
- u. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 119 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 132,
- v. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 120 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 142,
- 65 w. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 121 y/o la región variable de cadena pesada

definida en la SEQ ID NO: 138,

x. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 122 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 146,

y. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 123 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 147;

z. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 124 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 144;

aa. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,

bb. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,

cc. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 194,

dd. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 195,

ee. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 196, o

ff. la región variable de cadena ligera definida en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada definida en la SEQ ID NO: 197.

La región marco de las cadenas pesadas y/o ligeras descritas en el presente documento puede derivar de una o más de las regiones marco ilustradas en los anticuerpos descritos en el presente documento. El anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno pueden, por lo tanto, comprender una o más de las CDR descritas en el presente documento (por ejemplo, seleccionadas de las CDR específicas o las CDR consenso de la SEQ ID NO: 72 a 88 o de las variantes de CDR de la SEQ ID NO: 89-102) y las regiones marco que se originan de aquellas descritas en el presente documento. En las SEQ ID NO:103-154, las CDR esperadas se muestran en negrita, mientras que las regiones marco no.

La Tabla 1 se refiere a las secuencias completas de la cadena ligera y pesada de algunos de los anticuerpos anti-KAAG1 que se seleccionaron para pruebas biológicas.

Tabla 1.

Denominación anticuerpos	de	Tipo de cadena	Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:)	de (SEQ ID NO:)	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:)
3D3		Ligera (L)	3		4
3D3		Pesada (H)	5		6
3G10		Ligera	7		8
3G10		Pesada	9		10
3C4		Ligera	11		12
3C4		Pesada	13		14
3D3 humanizado		Ligera			166
3D3 humanizado		Pesada			167
3C4 humanizado		Ligera			170
3C4 humanizado		Pesada			171
3A4 humanizado		Ligera (Lh1)			199
3A4 humanizado		Ligera (Lh2)			200
3A4 humanizado		Pesada (Hh1)			202
3A4 humanizado		Pesada (Hh2)			203
3A4 humanizado		Pesada (Hh3)			204
3A4 humanizado		Pesada (Hh4)			205

Los estudios de mapeo de epítomos revelaron que el anticuerpo 3D3 interactúa con un epítomo de KAAG1 abarcado por los aminoácidos 36 - 60, inclusive. Los anticuerpos 3G10 y 3A4 interactúan con un epítomo de KAAG1 abarcado por los aminoácidos 61 - 84, inclusive, y el anticuerpo 3C4 interactúa con un epítomo de KAAG1 abarcado por los aminoácidos 1 - 35. Aunque, el 3G10 y el 3A4 se unen a una región similar, el anticuerpo 3G10 no se une a KAAG1 de manera tan eficaz como el anticuerpo 3A4.

Debe entenderse en el presente documento, que la región variable de cadena ligera de la combinación específica proporcionada anteriormente puede cambiarse por cualquier otra región variable de cadena ligera. Asimismo, la región variable de cadena pesada de la combinación específica proporcionada anteriormente se puede cambiar para

cualquier otra región variable de cadena pesada.

Las secuencias de las regiones variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos seleccionados que se unen a KAAG1 se divulgan en la Tabla 2.

5

Tabla 2

Denominación de Ac.	Tipo de región variable	Nucleótido (SEQ ID NO:)	Aminoácido (SEQ ID NO:)
3D3	Ligera (VL)	15	16
3D3	Pesada (VH)	17	18
3G10	Ligera	19	20
3G10	Pesada	21	22
3C4	Ligera	23	24
3C4	Pesada	25	26
3A2	Ligera		103
3A2	Pesada		126
3E10	Ligera		106
3E10	Pesada		145
3G12	Ligera		121
3G12	Pesada		138
3A4	Ligera	47	48
3A4	Pesada	45	46
3D3 humanizado	Ligera		168
3D3 humanizado	Pesada		169
3C4 humanizado	Ligera		172
3C4 humanizado	Pesada		173
3A4 humanizado	Ligera (Lvh1)		189
3A4 humanizado	Ligera (Lvh2)		190
3A4 humanizado	Pesada (Hvh1)		194
3A4 humanizado	Pesada (Hvh2)		195
3A4 humanizado	Pesada (Hvh3)		197
3A4 humanizado	Pesada (Hvh4)		198

Las SEQ ID NO: 103-154 corresponden a las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de otros anticuerpos que se ha demostrado que se unen a KAAG1.

10 La secuencia de las CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos seleccionados que se unen a KAAG1 se divulgan en la Tabla 3.

Tabla 3

Denominación de Ac.	Tipo de cadena	CDR	SEQ ID NO:	secuencia de a.a.
3D3	Ligera (L)	CDR L1	27	KSSQSLNLSNFQKNFLA
3D3	Ligera	CDR L2	28	FASTRES
3D3	Ligera	CDR L3	29	QQHYSTPLT
3D3	Pesada (H)	CDR H1	30	GYIFTDYEIH
3D3	Pesada	CDR H2	31	VIDPETGNTA
3D3	Pesada	CDR H3	32	MGYSDY
3G10	Ligera	CDR L1	33	RSSQSLLSHNGNTYLE
3G10	Ligera	CDR L2	34	KVSNRFS
3G10	Ligera	CDR L3	35	FQGSHVPLT
3G10	Pesada	CDR H1	36	GYFTFDNYMN
3G10	Pesada	CDR H2	37	DINPYYGTTT
3G10	Pesada	CDR H3	38	ARDDWFDY
3C4	Ligera	CDR L1	39	KASQDIHNFLN
3C4	Ligera	CDR L2	40	RANRLVD
3C4	Ligera	CDR L3	41	LQYDEIPLT

3C4	Pesada	CDR H1	42	GFSITSGYGWH
(continuación)				
Denominación de Ac.	Tipo de cadena	CDR	SEQ ID NO:	secuencia de a.a.
3C4	Pesada	CDR H2	43	YINYDGHND
3C4	Pesada	CDR H3	44	ASSYDGLFAY
3A2	Ligera	CDR L1	148	KSSQSLHSDGKTYLN
3A2	Ligera	CDR L2	149	LVSKLDS
3A2	Ligera	CDR L3	150	WQGTHFPRT
3A2	Pesada	CDR H1	151	GYTFTD YNMH
3A2	Pesada	CDR H2	152	YINPYNDVTE
3A2	Pesada	CDR H3	153	AWFGL RQ
3E10	Ligera	CDR L1	154	RSSKSLHSDGN TYLY
3E10	Ligera	CDR L2	155	RMSNLAS
3E10	Ligera	CDR L3	156	MQHLEYPYT
3E10	Pesada	CDR H1	157	GDTFTD YYMN
3E10	Pesada	CDR H2	158	DINPNYGGIT
3E10	Pesada	CDR H3	159	QAYYRNS DY
3G12	Ligera	CDR L1	160	KASQDVGTAVA
3G12	Ligera	CDR L2	161	WTSTRHT
3G12	Ligera	CDR L3	162	QQHYSIPLT
3G12	Pesada	CDR H1	163	GYIFTDYEIH
3G12	Pesada	CDR H2	164	VIDPETGNTA
3G12	Pesada	CDR H3	165	MGYSDY
3A4	Ligera	CDR L1	52	RSSQSLHSDGNNTYLE
3A4	Ligera	CDR L2	53	TVSNRFS
3A4	Ligera	CDR L3	54	FQGSHVPLT
3A4	Pesada	CDR H1	49	GYTFTDDYMS
3A4	Pesada	CDR H2	50 o 212	DINPYNGDTNYNQKFKG o DINPYNGDTN
3A4	Pesada	CDR H3	51	DPGAMDY

Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno variantes

- 5 La presente invención también abarca variantes de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes incluidos son aquellos que tienen una variación en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes incluidos en la presente divulgación son aquellos que tienen al menos una CDR variante (dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR variantes, etc., o incluso doce CDR variantes). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno
- 10 variantes incluyen aquellos que tienen una región variable de cadena ligera variante, una región variable de cadena pesada variante, una cadena ligera variante y/o una cadena pesada variante. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes incluidos en la presente invención son aquellos que tienen, por ejemplo, afinidad de unión similar o mejorada en comparación con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno original.
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "variante" se aplica a cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento e incluye, por ejemplo, una CDR variante (ya sea CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3) una región variable de cadena ligera variante, una región variable de cadena pesada variante, una cadena ligera variante, una cadena pesada variante, un anticuerpo variante, un fragmento de unión a antígeno variante y una variante de KAAG1.
- 20 Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables (CDR), pero también se contemplan modificaciones en la región marco o incluso en la región constante. Realizaciones a modo de ejemplo de variantes de CDR se proporcionan en las SEQ ID NO: 72-102.
- 25 Se pueden hacer sustituciones conservativas intercambiando un aminoácido (de una CDR, cadena variable, anticuerpo, etc.) de uno de los grupos enumerados a continuación (grupo 1 a 6) por otro aminoácido del mismo grupo.
- 30 Otras realizaciones a modo de ejemplo de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1A bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado una propiedad no deseada, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1A, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos y seleccionarse los productos.

Se sabe en la técnica que pueden generarse variantes mediante mutagénesis de sustitución y conservar la actividad biológica de los polipéptidos de la presente invención. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos eliminada y un resto diferente insertado en su lugar. Por ejemplo, un sitio de interés para la mutagénesis de sustitución puede incluir un sitio en el que los restos particulares obtenidos de diversas especies sean idénticos. En la Tabla 1A se muestran ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservativas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio deseado, entonces, se introducen otro tipo de sustituciones, denominadas "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1A, o como se describe más adelante en el presente documento en referencia a las clases de aminoácidos, y se seleccionan los productos.

Se logran modificaciones sustanciales en la función y en la identidad inmunitaria seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice. (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

(grupo 1) hidrófobos: norleucina, metionina (Met), Alanina (Ala), Valina (Val), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile)

(grupo 2) hidrófilos neutros: Cisteína (Cys), Serina (Ser), Treonina (Thr)

(grupo 3) ácidos: Acido aspártico (Asp), Acido glutámico (Glu)

(grupo 4) básicos: Asparagina (Asn), Glutamina (Gln), Histidina (His), Lisina (Lys), Arginina (Arg)

(grupo 5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Glicina (Gly), Prolina (Pro); y

(grupo 6) aromáticos: Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe)

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro.

Tabla 1A. Sustitución de aminoácidos

Resto original	Sustitución ejemplar	Sustituciones conservativas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

La variación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno variante puede incluir una adición de aminoácidos, delección, inserción, sustitución, etc., una o más modificaciones en la cadena principal o en la cadena lateral de uno o más aminoácidos, o una adición de un grupo u otra molécula a uno o más aminoácidos (cadenas laterales o cadena principal).

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno variante puede tener una similitud de secuencia y/o identidad de secuencia sustancial en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo

o fragmento de unión a antígeno original. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en el porcentaje de identidades (aminoácidos idénticos) y de la sustitución conservativa.

- 5 En general, el grado de similitud e identidad entre cadenas variables se ha determinado, en el presente documento, utilizando el programa de secuencia Blast2 (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) usando la configuración por defecto, es decir, programa blastp, Matriz BLOSUM62 (espacio abierto 11 y penalización de espacio de extensión 1; gapx dropoff 50, expect 10.0, tamaño de palabra 3) y filtros activados.
- 10 Por lo tanto, el porcentaje de identidad será indicativo de aminoácidos que son idénticos en comparación con el péptido original y que pueden ocupar la misma posición o similar. El porcentaje de similitud será indicativo de aminoácidos que son idénticos y aquellos que se reemplazan con una sustitución de aminoácidos conservativa en comparación con el péptido original en la misma posición o similar.
- 15 Las variantes de la presente invención comprenden, por lo tanto, aquellas que pueden tener al menos el 70%, el 75 %, el 80 %, el 81 %, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.
- 20 Realizaciones a modo de ejemplo de variantes son aquellas que tienen al menos el 81% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 81%, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.
- 25 Otras realizaciones a modo de ejemplo de variantes son aquellas que tienen al menos el 82 % de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.
- 30 Más realizaciones a modo de ejemplo adicionales de variantes son aquellas que tienen al menos el 85 % de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.
- 35 Otras realizaciones a modo de ejemplo de variantes son aquellas que tienen al menos el 90 % de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.
- 40 Realizaciones a modo de ejemplo adicionales de variantes son aquellas que tienen al menos el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.
- 45 Aún realizaciones a modo de ejemplo adicionales de variantes son aquellas que tienen al menos el 97 % de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 97 %, el 98 %, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una porción de una secuencia original.
- 50 Para fines de concisión, el presente solicitante proporciona, en el presente documento, una Tabla 1B que ilustra realizaciones a modo de ejemplo de variantes individuales abarcadas por la presente invención y que comprenden el % de identidad de secuencia y el % de similitud de secuencia especificados. Cada "X" debe interpretarse como que define una variante dada.

Tabla 1B		Porcentaje (%) de identidad de secuencia																				
		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Porcentaje (%)	80	X																				
	81	X	X																			
	82	X	X	X																		
	83	X	X	X	X																	
	84	X	X	X	X	X																
	85	X	X	X	X	X	X															
	86	X	X	X	X	X	X	X														
	87	X	X	X	X	X	X	X	X													

88	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

(continuación)

Tabla 1B	Porcentaje (%) de identidad de secuencia																			
89	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
90	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
92	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
93	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
94	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
95	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
97	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
98	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
99	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

5 La presente divulgación abarca CDR, regiones variables de cadena ligera, regiones variables de cadena pesada, cadenas ligeras, cadenas pesadas, anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno que comprenden al menos el 70% de identidad o al menos el 80% de identidad con la secuencia descrita en el presente documento.

La presente invención abarca, por lo tanto, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que son capaces de unirse específicamente a KAAG1 y que pueden comprender:

10 d. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 48 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 46;

En el presente documento se divulgan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que son capaces de unirse específicamente a KAAG1 y que pueden comprender secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

15 a. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18,

20 b. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22;

c. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26;

25 d. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 48 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 46;

e. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 103 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 126,

30 f. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 104 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 127,

g. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 105 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 128,

35 h. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 106 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 145,

40 i. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 107 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 128,

j. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 108 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 130,

45 k. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 109 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 141,

- l. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 110 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 131,
- 5 m. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 111 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 134,
- n. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 112 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 135,
- 10 o. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 113 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 136,
- p. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 114 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 133,
- 15 q. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 115 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 140,
- r. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 116 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 137,
- 20 s. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 117 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 144,
- 25 t. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 118 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 139,
- u. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 119 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 132,
- 30 v. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 120 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 142,
- w. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 121 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 138,
- 35 x. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 122 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 146,
- 40 y. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 123 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 147,o;
- 45 z. una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 124 y una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 143.

En conformidad con la presente invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes comprenden CDR que son idénticas a las de la región variable de cadena ligera y/o cadena pesada correspondiente. En otros ejemplos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes pueden comprender CDR variantes.

Por lo tanto, ejemplos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno variante son aquellos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos el 70%, el 75 %, el 80 % idéntica con las SEQ ID NO: 16, 20, 24, 103, 106 o 121. Las CDR de dicha variante pueden ser idénticas a las del correspondiente anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no variante (secuencia de tipo silvestre) o pueden variar de 1-3 aminoácidos.

Otra región variable de cadena ligera de anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 16 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 22 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 16. Se proporciona una variante de la SEQ ID NO: 16 en la SEQ ID NO: 168.

Una región variable de cadena ligera de anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 20 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 22 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región

marco de la SEQ ID NO: 20.

Una región variable de cadena ligera de anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 24 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 21 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 24. Se proporciona una variante de la SEQ ID NO: 24 en la SEQ ID NO: 172.

Una región variable de cadena ligera de anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 103 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 22 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 103.

Una región variable de cadena ligera de anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 106 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 22 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 106.

Una región variable de cadena ligera de anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 121 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 21 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 121.

En algunos casos, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo variante puede comprender deleciones o adiciones de aminoácidos (en combinación o no con sustituciones de aminoácidos). Con frecuencia, se pueden tolerar 1, 2, 3, 4 o 5 deleciones o adiciones de aminoácidos.

Otros ejemplos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno variante son aquellos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos el 70%, el 75 %, el 80 % idéntica a las SEQ ID NO: 18, 22, 26, 126, 138 o 145. Las CDR de dicha variante pueden ser idénticas a las del correspondiente anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no variante (secuencia de tipo silvestre) o pueden variar de 1-3 aminoácidos.

Un ejemplo de una región variable de cadena pesada del anticuerpo variante abarca una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 18 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 22 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 18. Se proporciona una variante de la SEQ ID NO: 18 en la SEQ ID NO: 169.

Una región variable de cadena pesada del anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 22 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 23 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 22.

Una región variable de cadena pesada del anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 26 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 23 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 26. Se proporciona una variante de la SEQ ID NO: 26 en la SEQ ID NO: 173.

Una región variable de cadena pesada del anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 126 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 23 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 126.

Una región variable de cadena pesada del anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 145 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 23 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 145.

Una región variable de cadena pesada del anticuerpo variante a modo de ejemplo abarca una región variable de

cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos de las CDR que son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de las CDR de la SEQ ID NO: 138 y que tienen, por ejemplo, de 1 a 22 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas) en su región marco en comparación con la región marco de la SEQ ID NO: 138.

5 En algunos casos, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo variante puede comprender deleciones o adiciones de aminoácidos (en combinación o no con sustituciones de aminoácidos). Con frecuencia, se pueden tolerar 1, 2, 3, 4 o 5 deleciones o adiciones de aminoácidos.

10 CDR variantes

También se divulgan en el presente documento polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden cadenas variables que tienen al menos una sustitución de aminoácidos conservativa en al menos una de las CDR descritas en el presente documento (en comparación con la CDR original).

15 La presente divulgación también abarca polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden cadenas variables que tienen al menos una sustitución de aminoácidos conservativa en al menos dos de las CDR (en comparación con las CDR originales).

20 La presente divulgación también abarca polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden cadenas variables que tienen al menos una sustitución de aminoácido conservativa en las 3 CDR (en comparación con la CDR original).

25 La presente divulgación también abarca polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden cadenas variables que tienen al menos dos sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos una de las CDR (en comparación con la CDR original).

30 La presente divulgación también abarca polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden cadenas variables que tienen al menos dos sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos dos de las CDR (en comparación con las CDR originales).

35 La presente divulgación también abarca polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden cadenas variables que tienen al menos dos sustituciones de aminoácidos conservativas en las 3 CDR (en comparación con la CDR original).

40 La comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera o las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos que muestran las mayores características permitió, a los presentes inventores, derivar secuencias consenso dentro de las CDR y dentro de las regiones variables. El consenso para las CDR se proporciona en las SEQ ID NO: 72 a 88.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona en un ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado que comprende una región variable de cadena ligera que tiene;

- a. una secuencia CDRL1 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: y SEQ ID NO:73;
- b. una secuencia CDRL2 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO:76, o;
- c. una secuencia CDRL3 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79.

50 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona en un ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado que comprende una región variable de cadena pesada que tiene;

- a. una secuencia CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:80;
- b. una secuencia CDRH2 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:85, o;
- c. una secuencia CDRH3 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87 y SEQ ID NO:88.

60 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL1 que comprende o consiste en la fórmula:

$X_{1a}SSX_{2a}SLLX_{3a}X_{4a}X_{5a}X_{6a}X_{7a}X_{8a}X_{9a}X_{10a}LX_{11a}$ (SEQ ID NO:72)
 en donde X_{1a} puede ser un aminoácido básico;
 en donde X_{2a} puede ser un aminoácido básico;
 en donde X_{3a} puede ser H, Y o N;
 en donde X_{4a} puede ser S, T, N o R;

en donde X_{5a} puede estar ausente, ser S o N;
 en donde X_{6a} puede ser D, F o N;
 en donde X_{7a} puede ser G o Q;
 en donde X_{8a} puede ser K, L o N;
 5 en donde X_{9a} puede ser T o N;
 en donde X_{10a} puede ser un aminoácido aromático, y;
 en donde X_{11a} puede ser A, N, E o Y.

En una divulgación a modo de ejemplo, X_{1a} puede ser K o R.

En otra divulgación, X_{2a} puede ser Q o K.

En aún otra divulgación, X_{3a} puede ser N o H.

15 En una divulgación adicional, X_{10a} puede ser Y o F.

Divulgaciones más específicas incluyen la CDRL1 de la SEQ ID NO: donde: X_{1a} es K; X_{2a} es Q; X_{3a} es N; X_{3a} es H; X_{4a} es S; X_{4a} es T; X_{5a} es S; X_{5a} está ausente; X_{6a} es N; X_{7a} es Q; X_{7a} es G; X_{8a} es K; X_{9a} es N; X_{9a} es T; X_{10a} es Y; o X_{11a} es A.

20 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL1 que comprende o consiste en la fórmula:

$KASQDX_{1b}X_{2b}X_{3b}X_{4b}X_{5b}X_{6b}$ (SEQ ID NO:73)
 25 en donde X_{1b} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 en donde X_{2b} puede ser G o H;
 en donde X_{3b} puede ser T, N o R;
 en donde X_{4b} puede ser F, Y o A;
 en donde X_{5b} puede ser un aminoácido hidrófobo, y;
 30 en donde X_{6b} puede ser N o A.

En una divulgación a modo de ejemplo, X_{1b} puede ser V o I.

En otra divulgación a modo de ejemplo, X_{5b} puede ser V o L.

35 Divulgaciones más específicas incluyen la CDRL1 de la SEQ ID NO: 73 donde X_{1b} es I; X_{2b} es H; X_{3b} es T; X_{3b} es N; X_{4b} es Y; X_{4b} es F; X_{5b} es L o X_{6b} es N.

Otras divulgaciones a modo de ejemplo de CDRL1 se proporcionan en las SEQ ID NO: 89 y 90.

40 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL2 que comprende o consiste en la fórmula:

$FX_{1c}STX_{2c}X_{3c}S$ (SEQ ID NO:74)
 45 En donde X_{1c} es A o G;
 En donde X_{2c} es R o T, y;
 En donde X_{3c} es E, K o A.

En una divulgación a modo de ejemplo, X_{1c} puede ser A y X_{2c} puede ser T.

En otra divulgación a modo de ejemplo, X_{1c} puede ser A y X_{2c} puede ser R.

Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRL2 de la SEQ ID NO: 74 donde X_{1c} es A; X_{2c} es R o X_{3c} es E.

55 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL2 que comprende o consiste en la fórmula:

$X_{1d}VSX_{2d}X_{3d}X_{4d}S$ (SEQ ID NO:75)
 60 En donde X_{1d} puede ser L o K;
 En donde X_{2d} puede ser un aminoácido básico;
 En donde X_{3d} puede ser L o R;
 En donde X_{4d} puede ser D o F.

En una divulgación a modo de ejemplo, X_{2d} puede ser K o N.

65 Otras divulgaciones más específicas incluyen la CDRL2 de la SEQ ID NO: 75 donde X_{1d} es L; X_{2d} es K; X_{3d} es L o X_{4d}

es D.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL2 que comprende o consiste en la fórmula:

- 5 $X_{1e}ANRLVX_{2e}$ (SEQ ID NO:76)
 En donde X_{1e} puede ser un aminoácido básico, y;
 En donde X_{2e} puede ser D o A.

En una divulgación a modo de ejemplo, X_{1e} puede ser R o H.

- 10 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRL2 de la SEQ ID NO: 76 donde X_{1e} es R o X_{2e} es D.

Otras divulgaciones a modo de ejemplo de CDRL2 se proporcionan en las SEQ ID NO: 91-93.

- 15 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL3 que comprende o consiste en la fórmula:

- 20 $X_{1f}QX_{2f}X_{3f}X_{4f}X_{5f}PLT$ (SEQ ID NO:77)
 En donde X_{1f} puede ser Q o L.;
 en donde X_{2f} puede ser un aminoácido aromático;
 En donde X_{3f} puede ser D, F o Y;
 En donde X_{4f} puede ser E, A, N o S, y;
 En donde X_{5f} puede ser I, F o T.

- 25 En una divulgación a modo de ejemplo de la invención, X_{2f} puede ser Y o H.

En otra divulgación a modo de ejemplo de la invención, X_{3f} puede ser Y o D.

En aún otra divulgación a modo de ejemplo de la invención, X_{5f} puede ser I o T.

- 30 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRL3 de la SEQ ID NO: 77 donde X_{1f} es Q; X_{2f} es H; X_{3f} es D; X_{3f} es Y; X_{4f} es S; X_{4f} es E; X_{4f} es A; X_{5f} es T, o X_{5f} es I.

- 35 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL3 que comprende o consiste en la fórmula:

- 40 $QQHX_{1g}X_{2g}X_{3g}PLT$ (SEQ ID NO:78)
 en donde X_{1g} puede ser un aminoácido aromático;
 En donde X_{2g} puede ser N o S, y;
 En donde X_{3g} puede ser I o T.

En unas divulgaciones a modo de ejemplo, X_{1g} puede ser F o Y

- 45 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRL3 de la SEQ ID NO: 78 donde X_{2g} es S o X_{3g} es T.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRL3 que comprende o consiste en la fórmula:

- 50 $X_{1h}QGQX_{2h}HX_{3h}PX_{4h}T$ (SEQ ID NO:79)
 en donde X_{1h} puede ser un aminoácido aromático;
 En donde X_{2h} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;
 En donde X_{3h} puede ser F o V, y;
 En donde X_{4h} puede ser R o L.

- 55 En una divulgación a modo de ejemplo, X_{1h} puede ser W o F.

En otra divulgación a modo de ejemplo, X_{2h} puede ser S o T.

- 60 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRL3 de la SEQ ID NO: 79 donde X_{1h} es W; X_{2h} es T; X_{3h} es F o X_{4h} es R.

Otras divulgaciones a modo de ejemplo de CDRL3 se proporcionan en las SEQ ID NO: 94 y 95.

- 65 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH1 que comprende o consiste en la fórmula:

GYX_{1i}FX_{2i}X_{3i}YX_{4i}X_{5i}H (SEQ ID NO:80)

en donde X_{1i} puede ser T, I o K;

En donde X_{2i} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;

en donde X_{3i} puede ser un aminoácido ácido;

5 En donde X_{4i} puede ser E, N o D, y;

en donde X_{5i} puede ser un aminoácido hidrófobo.

En una divulgación a modo de ejemplo, X_{2i} puede ser T o S.

10 En otra divulgación a modo de ejemplo, X_{3i} puede ser D o E.

En aún otra divulgación a modo de ejemplo, X_{4i} puede ser N o E.

En una divulgación a modo de ejemplo adicional, X_{5i} puede ser M, I o v.

15 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH1 de la SEQ ID NO: 80 donde X_{2i} es T; X_{3i} es D; X_{4i} es E; X_{5i} es I o X_{5i} es M.

Otras divulgaciones a modo de ejemplo de CDRH1 se proporcionan en las SEQ ID NO: 96 y 97.

20 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH2 que comprende o consiste en la fórmula:

X_{1j}X_{2j}DPX_{3j}TGX_{4j}TX_{5j} (SEQ ID NO:81)

25 En donde X_{1j} puede ser V o G

en donde X_{2j} puede ser un aminoácido hidrófobo;

En donde X_{3j} puede ser A, G o E;

En donde X_{4j} puede ser R, G, D, A, S, N o V, y;

en donde X_{5j} puede ser un aminoácido hidrófobo.

30 En una divulgación a modo de ejemplo, X_{2j} puede ser I o L.

En otra divulgación a modo de ejemplo, X_{5j} puede ser A o V.

35 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH2 de la SEQ ID NO: 81 donde X_{1j} es V; X_{2j} es I; X_{3j} es E; X_{4j} es D o X_{5j} es A.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH2 que comprende o

40 consiste en la fórmula:

VX_{1k}DPX_{2k}TGX_{3k}TA (SEQ ID NO:82)

En donde X_{1k} puede ser un aminoácido hidrófobo;

En donde X_{2k} puede ser A, E o G;

En donde X_{3k} puede ser R, G, A, S, N V o D.

45 En una divulgación a modo de ejemplo, X_{1k} puede ser L o I.

Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH2 de la SEQ ID NO: 82 donde X_{1k} es I; X_{2k} es E o X_{3k} es D.

50 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH2 que comprende o consiste en la fórmula:

YIX_{1i}X_{2i}X_{3i}GX_{4i}X_{5i}X_{6i} (SEQ ID NO.:83)

En donde X_{1i} puede ser S o N;

55 En donde X_{2i} puede ser un aminoácido aromático

En donde X_{3i} puede ser D, E o N;

En donde X_{4i} puede ser D o H;

En donde X_{5i} puede ser Y, S o N;

En donde X_{6i} puede ser D, E o N.

60 En una divulgación a modo de ejemplo, X_{3i} puede ser D o N.

En otra divulgación a modo de ejemplo, X_{6i} puede ser D o N.

65 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH2 de la SEQ ID NO: 83 donde X_{2i} es F o Y, X_{3i} es N, X_{4i} es D o X_{6i} es N.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH2 que comprende o consiste en la fórmula:

5 $X_{1m}INPYNX_{2m}VTE$ (SEQ ID NO.:84)
 en donde X_{1m} puede ser N o Y, y;
 en donde X_{2m} puede ser E, D o N.

En una divulgación a modo de ejemplo, X_{2m} puede ser D o N.

10 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH2 de la SEQ ID NO: 84 donde X_{1m} es N o X_{2m} es D.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH2 que comprende o consiste en la fórmula:

15 $DINPX_{1n}YGX_{2n}X_{3n}T$ (SEQ ID NO.:85)
 En donde X_{1n} puede ser N o Y.,
 En donde X_{2n} puede ser G o T y;
 en donde X_{3n} puede ser I o T.

20 Otras divulgaciones a modo de ejemplo de CDRH2 se proporcionan en las SEQ ID NO: 98 y 99.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH3 que comprende o consiste en la fórmula:

25 $MX_{1o}X_{2o}X_{3o}DY$ (SEQ ID NO.:86)
 En donde X_{1o} puede ser G o S;
 En donde X_{2o} puede ser Y o H, y;
 en donde X_{3o} puede ser A o S.

30 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH3 de la SEQ ID NO: 86 donde X_{1o} es G; X_{2o} es Y o X_{3o} es S.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH3 que comprende o consiste en la fórmula:

35 $IX_{1p}YAX_{2p}DY$ (SEQ ID NO.:87)
 En donde X_{1p} puede ser G o S y;
 En donde X_{2p} puede estar ausente o ser M.

40 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH3 de la SEQ ID NO: 87 donde X_{1p} es S o X_{2p} es M.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo puede comprender una secuencia CDRH3 que comprende o consiste en la fórmula:

45 $AX_{1q}X_{2q}GLRX_{3q}$ (SEQ ID NO.:88)
 En donde X_{1q} puede ser R o W;
 En donde X_{2q} puede ser un aminoácido aromático y;
 en donde X_{3q} puede ser un aminoácido básico.

50 En una divulgación a modo de ejemplo, X_{2q} puede ser W o F.

En otra divulgación a modo de ejemplo, X_{3q} puede ser Q o N.

55 Otras divulgaciones específicas incluyen la CDRH3 de la SEQ ID NO: 88 donde X_{1q} es R; X_{2q} es W o X_{3q} es N.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes abarcados por la presente invención incluyen aquellos que pueden comprender una inserción, una delección o una sustitución de aminoácidos (conservativa o no conservativa). Estas variantes pueden tener al menos un resto de aminoácido en su secuencia de aminoácidos eliminado y un resto diferente insertado en su lugar.

60 Anticuerpos humanizados

Realizaciones a modo de ejemplo de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno variantes de la presente invención son un grupo de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno capaces de unirse a KAAG1 y caracterizados en el presente documento como por ser humanizados.

65

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno humanizados de la presente divulgación incluyen, más particularmente, anticuerpos 3D3, 3A4 o 3C4 y fragmentos de unión a antígeno humanizados. Los anticuerpos 3A4 y los fragmentos de unión a antígeno humanizados pueden usarse de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos 3D3, 3A4 o 3C4 humanizados tienen al menos una diferencia de aminoácidos en una región marco en comparación con el anticuerpo monoclonal 3D3, 3A4 o 3C4.

Se generaron y probaron anticuerpos 3A4 humanizados que tenían CDR idénticas a las del anticuerpo monoclonal 3A4 (VL: SEQ ID NO:48, VH: SEQ ID NO:46). Estos anticuerpos humanizados comprenden hasta 11 sustituciones de aminoácidos (de una a once) en la región de marco variable de la cadena ligera y hasta 23 sustituciones de aminoácidos (de una a veintitrés) en la región de marco variable de la cadena pesada en comparación con el anticuerpo monoclonal 3A4. El presente solicitante ha demostrado que estos anticuerpos 3A4 humanizados se unen a KAAG1 tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal 3A4.

Realizaciones a modo de ejemplo de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes incluyen aquellos que tienen una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 186:

SEQ ID NO.:186

**DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHVPLTFGXGTXLEXK,**

en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 48. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, un aminoácido encontrado en una posición correspondiente de un anticuerpo humano natural o un anticuerpo humano consenso. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

Otra realización a modo de ejemplo de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno variante incluye aquellos que tienen una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 187:

SEQ ID NO.:187

**DX_{e1}VMTQTPLSLX_{e2}VX_{e3}X_{e4}GX_{e5}X_{e6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{e7}L
LIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{e8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{e9}GT
X_{e10}LEX_{e11}K,**

en donde X_{e1} puede ser un aminoácido hidrófobo;
En donde X_{e2} puede ser A o P;
En donde X_{e3} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;
En donde X_{e4} puede ser L o P;
en donde X_{e5} puede ser un aminoácido ácido;
En donde X_{e6} puede ser Q o P;
En donde X_{e7} puede ser un aminoácido básico;
en donde X_{e8} puede ser un aminoácido hidrófobo;
En donde X_{e9} puede ser A o Q;
En donde X_{e10} puede ser un aminoácido básico; o
En donde X_{e11} puede ser un aminoácido hidrófobo,
en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 48.

Una realización a modo de ejemplo adicional de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno variante incluye aquellos que tienen una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 188:

SEQ ID NO.:188

**DX_{E1}VMTQTPLSLX_{E2}VX_{E3}X_{E4}GX_{E5}X_{E6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{E7}
LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{E8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{E9}G
TX_{E10}LEX_{E11}K**

En donde X_{E1} puede ser V o I

En donde X_{E2} puede ser A o P

En donde X_{E3} puede ser S o T

En donde X_{E4} puede ser L o P

5 En donde X_{E5} puede ser D o E

En donde X_{E6} puede ser Q o P

En donde X_{E7} puede ser K o Q

En donde X_{E8} puede ser L o V

En donde X_{E9} puede ser A o Q

10 En donde X_{E10} puede ser R o K o

En donde X_{E11} puede ser L o I,

en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 48.

15 De acuerdo con una realización, la variante del dominio variable de cadena ligera puede tener una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 189 o 190:

SEQ ID NO.:189

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNR

FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGKLEIK.

20

SEQ ID NO.:190

DVVMQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNR

FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGKLEIK.

25 Realizaciones a modo de ejemplo de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes incluyen aquellos que tienen una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 191.

SEQ ID NO.:191

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNG

DTNYNQKFKGXXXXTDXSXSTAYMLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXTV

VSS,

30 en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 46. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, un aminoácido encontrado en una posición correspondiente de un anticuerpo humano natural o un anticuerpo humano consenso. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

35 Otra realización a modo de ejemplo de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno variante incluye aquellos que tienen una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 192:

SEQ ID NO.:192

$QX_{f1}QLVQSGX_{f2}EX_{f3}X_{bf4}KPGASVKX_{f5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{f6}QX_{f7}X_{f8}GX_{f9}X_{f10}LEW$

$X_{f11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{f12}X_{f13}X_{bf14}X_{f15}TX_{f16}DX_{f17}SX_{f18}STAYMX_{f19}LX_{f20}SLX_{f21}SED$

$X_{f22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXX_{f23}VTVSS,$

40 en donde X_{f1} puede ser un aminoácido hidrófobo;

En donde X_{bf2} puede ser P o A;

En donde X_{f3} puede ser un aminoácido hidrófobo;

En donde X_{f4} puede ser V o K;

En donde X_{f5} puede ser un aminoácido hidrófobo;

45 En donde X_{f6} puede ser un aminoácido básico;

En donde X_{f7} puede ser S o A;

En donde X_{f8} puede ser H o P;

- En donde X_{f9} puede ser un aminoácido básico;
 En donde X_{f10} puede ser S o G;
 En donde X_{f11} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 En donde X_{f12} puede ser un aminoácido básico;
 5 En donde X_{f13} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 En donde X_{f14} puede ser I o T;
 En donde X_{f15} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 En donde X_{f16} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 En donde X_{f17} puede ser K o T;
 10 En donde X_{f18} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;
 En donde X_{f19} puede ser Q o E;
 En donde X_{f20} puede ser N o S;
 En donde X_{f21} puede ser T o R;
 En donde X_{f22} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro; o
 15 En donde X_{f23} puede ser S o L,
 en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 46.
- 20 Una realización a modo de ejemplo adicional de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno variante incluye aquellos que tienen una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 193:

SEQ ID NO.:193

**QX_{F1}QLVQSGX_{F2}EX_{F3}X_{F4}KPGASVKX_{F5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{F6}QX_{F7}X_{F8}GX_{F9}X_{F10}L
 EWX_{F11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{F12}X_{F13}X_{F14}X_{F15}TX_{F16}DX_{F17}SX_{F18}STAYMX_{F19}LX_{F20}SL
 X_{F21}SEDX_{F22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXX_{F23}VTVSS**

- 25 En donde X_{F1} puede ser I o V;
 En donde X_{F2} puede ser P o A;
 En donde X_{F3} puede ser M o V;
 En donde X_{F4} puede ser V o K;
 En donde X_{F5} puede ser M o V;
 30 En donde X_{F6} puede ser K o R;
 En donde X_{F7} puede ser S o A;
 En donde X_{F8} puede ser H o P;
 En donde X_{F9} puede ser K o Q;
 En donde X_{F10} puede ser S o G;
 35 En donde X_{F11} puede ser I o M;
 En donde X_{F12} puede ser K o R;
 En donde X_{F13} puede ser A o V;
 En donde X_{F14} puede ser I o T;
 En donde X_{F15} puede ser L o I;
 40 En donde X_{F16} puede ser V o A;
 En donde X_{F17} puede ser K o T;
 En donde X_{F18} puede ser S o T;
 En donde X_{F19} puede ser Q o E;
 En donde X_{F20} puede ser N o S;
 45 En donde X_{F21} puede ser T o R;
 En donde X_{F22} puede ser S o T; o
 En donde X_{F23} puede ser S o L,
 en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 46.
- 50

De acuerdo con una realización, la variante del dominio variable de cadena pesada puede tener una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 194 o 197:

SEQ ID NO.:194

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNG
DTNYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLVTV
SS.

SEQ ID NO.:195

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNG
DTNYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLVTV
VSS.

SEQ ID NO.:196

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGD
TNYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLVTV
SS.

5

SEQ ID NO.:197

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLVTVS
S.

- 10 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo 3D3 humanizado puede tener una región variable de cadena ligera de fórmula:

**DIVMTQSPXSLAVSXGXXTXNCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQKPGQXPKLLIYFAS
TRESSXPDRFXGSGSGTDFTLTSSXQAEDXAXYXCQQHYSTPLTFGXGKLEKX (SEQ
ID NO.:174);**

- 15 en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 16. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

- 20 De acuerdo con una divulgación más específica, el anticuerpo 3D3 humanizado puede tener una región variable de cadena ligera de fórmula:

**DIVMTQSPX_{A1}SLAVSX_{A2}GX_{A3}X_{A4}X_{A5}TX_{A6}NCKSSQSLLNSNFQKNFLAWYQQK
GQX_{A7}PKLLIYFASTRESSX_{A8}PDRFX_{A9}GSGSGTDFTLTSSX_{A10}QAEDX_{A11}AX_{A12}YX_{A13}CQ
QHYSTPLTFGX_{A14}GKLEKX_{A15}K (SEQ ID NO.:175);**

- 25 En donde X_{A1} puede ser, por ejemplo, D o S;
En donde X_{A2} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente L o I;
En donde X_{A3} puede ser, por ejemplo, E o Q;
En donde X_{A4} puede ser, por ejemplo, un aminoácido básico o más particularmente R o K;
En donde X_{A5} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente A o V;
En donde X_{A6} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente I o M;
30 En donde X_{A7} puede ser, por ejemplo, P o S;
En donde X_{A8} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o I;
En donde X_{A9} puede ser, por ejemplo, S o I;
En donde X_{A10} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente L o V;
En donde X_{A11} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o L;
35 En donde X_{A12} puede ser, por ejemplo, V o D;
En donde X_{A13} puede ser, por ejemplo, un aminoácido aromático o más particularmente Y o F;

En donde X_{A14} puede ser, por ejemplo, Q o A y;

En donde X_{A15} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente I o L.

5 De acuerdo con una divulgación aún más específica, el anticuerpo 3D3 humanizado puede tener una región variable de cadena ligera de fórmula:

DIVMTQSPX_{a1}SLAVSX_{a2}GX_{a3}X_{a4}X_{a5}TX_{a6}NCKSSQSLNNSNFQKNFLAWYQQKP
 GQX_{a7}PKLLIY**FASTRESS**X_{a8}PDRFX_{a9}GSX_{a10}GTDFTLTSSX_{a10}QAEDX_{a11}AX_{a12}YX_{a13}**CQQ**
HYSTPLTFGX_{a14}GTKLEX_{a15}K (SEQ ID NO.:176);

- 10 En donde X_{a1} puede ser, por ejemplo, D o S;
 En donde X_{a2} puede ser, por ejemplo, L o I;
 En donde X_{a3} puede ser, por ejemplo, E o Q;
 En donde X_{a4} puede ser, por ejemplo, R o K;
 En donde X_{a5} puede ser, por ejemplo, A o V;
 En donde X_{a6} puede ser, por ejemplo, I o M;
 15 En donde X_{a7} puede ser, por ejemplo, P o S;
 En donde X_{a8} puede ser, por ejemplo, V o I;
 En donde X_{a9} puede ser, por ejemplo, S o I;
 En donde X_{a10} puede ser, por ejemplo, L o V;
 En donde X_{a11} puede ser, por ejemplo, V o L;
 20 En donde X_{a12} puede ser, por ejemplo, V o D;
 En donde X_{a13} puede ser, por ejemplo, Y o F;
 En donde X_{a14} puede ser, por ejemplo, Q o A y;
 En donde X_{a15} es, por ejemplo, I o L.

25 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo 3D3 humanizado puede tener una región variable de cadena pesada de fórmula:

EVQLXQSSXAEXXPGASVXXSCKAS**GYIFTDYEIHWVXQXPXXGLEWXGVIDPE**
TGNTAFNQKFKGXXTXTADXSXSTAYMELSSLTSEDXAVYYCMGYSDYWGQGTXXTV
SS (SEQ ID NO.:177);

30 en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 18. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

35 De acuerdo con una divulgación más específica, el anticuerpo 3D3 humanizado puede tener una región variable de cadena pesada de fórmula:

EVQLX_{B1}QSX_{B2}AEX_{B3}X_{B4}X_{B5}PGASVX_{B6}X_{B7}SCKAS**GYIFTDYEIHWVX_{B8}QX_{B9}PX_{B1}**
X_{B11}GLEWX_{B12}GVIDPETGNTAFNQKFKGX_{B13}X_{B14}TX_{B15}TADX_{B16}SX_{B17}STAYMELSSLTS
EDX_{B18}AVYYCMGYSDYWGQGTX_{B19}X_{B20}TVSS (SEQ ID NO.:178),

- 40 En donde X_{B1} puede ser, por ejemplo, V o Q;
 En donde X_{B2} puede ser, por ejemplo, G o V;
 En donde X_{B3} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o L;
 En donde X_{B4} puede ser, por ejemplo, K o V;
 En donde X_{B5} puede ser, por ejemplo, un aminoácido básico o más particularmente K o R;
 45 En donde X_{B6} puede ser, por ejemplo, K o T;
 En donde X_{B7} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o L;
 En donde X_{B8} puede ser, por ejemplo, un aminoácido básico o más particularmente R o K;
 En donde X_{B9} puede ser, por ejemplo, A o T;
 En donde X_{B10} puede ser, por ejemplo, G o V;
 50 En donde X_{B11} puede ser, por ejemplo, Q o H;
 En donde X_{B12} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente M o I;
 En donde X_{B13} puede ser, por ejemplo, un aminoácido básico o más particularmente R o K;
 En donde X_{B14} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o A;
 En donde X_{B15} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente I o L;
 55 En donde X_{B16} puede ser, por ejemplo, T o I;

En donde X_{B17} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente T o S;
 En donde X_{B18} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente T o S;
 En donde X_{B19} puede ser, por ejemplo, L o T y;
 En donde X_{B20} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o L.

5 De acuerdo con una divulgación más específica, el anticuerpo 3D3 humanizado puede tener una región variable de cadena pesada de fórmula:

EVQLX_{b1}QSX_{b2}AEX_{b3}X_{b4}X_{b5}PGASVX_{b6}X_{b7}SCKASGYIFTDYEIHWVX_{b8}QX_{b9}PX_{b10}
 X_{b11}GLEWX_{b12}GVIDPETGNTAFNQKFKGX_{b13}X_{b14}TX_{b15}TADX_{b16}SX_{b17}STAYMELSSLTSE
 DX_{b18}AVYYCMGYSDYWGQGTGX_{b19}X_{b20}TVSS (SEQ ID NO.:179);

10 En donde X_{b1} puede ser, por ejemplo, V o Q;
 En donde X_{b2} puede ser, por ejemplo, G o V;
 En donde X_{b3} puede ser, por ejemplo, V o L;
 En donde X_{b4} puede ser, por ejemplo, K o V;
 15 En donde X_{b5} puede ser, por ejemplo, K o R;
 En donde X_{b6} puede ser, por ejemplo, K o T;
 En donde X_{b7} puede ser, por ejemplo, V o L;
 En donde X_{b8} puede ser, por ejemplo, R o K;
 En donde X_{b9} puede ser, por ejemplo, A o T;
 20 En donde X_{b10} puede ser, por ejemplo, G o V;
 En donde X_{b11} puede ser, por ejemplo, Q o H;
 En donde X_{b12} puede ser, por ejemplo, M o I;
 En donde X_{b13} puede ser, por ejemplo, R o K;
 En donde X_{b14} puede ser, por ejemplo, V o A;
 25 En donde X_{b15} puede ser, por ejemplo, I o L;
 En donde X_{b16} puede ser, por ejemplo, T o I;
 En donde X_{b17} puede ser, por ejemplo, T o S;
 En donde X_{b18} puede ser, por ejemplo, T o S;
 En donde X_{b19} puede ser, por ejemplo, L o T;
 30 En donde X_{b20} puede ser, por ejemplo, V o L.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo 3C4 humanizado puede tener una región variable de cadena ligera de fórmula:

DIVMXQSPSSXXASXGXRVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKXPKTLIFRANRL
 VDGVPSRFSGSGSGXDYXLTISLXXEDXXXYSCLQYDEIPLTFGXGTKLEXX (SEQ ID
 35 NO.:180);

en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 24. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

40 De acuerdo con una divulgación más específica, el anticuerpo 3C4 humanizado puede tener una región variable de cadena ligera de fórmula:

DIVMX_{C1}QSPSSX_{C2}X_{C3}ASX_{C4}GX_{C5}RVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{C6}PKT
 LIFRANRLVDGVPSRFSGSGSGX_{C7}DYX_{C8}LTISLX_{C9}X_{C10}EDX_{C11}X_{C12}X_{C13}YSCLQYDEIP
 45 LTFGX_{C14}GTKLEX_{C15}X_{C16} (SEQ ID NO.:181);

En donde X_{C1} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente T o S;
 En donde X_{C2} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente L o M;
 En donde X_{C3} puede ser, por ejemplo, S o Y;
 En donde X_{C4} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o L;
 50 En donde X_{C5} puede ser, por ejemplo, un aminoácido ácido o más particularmente D o E;
 En donde X_{C6} puede ser, por ejemplo, A o S;
 En donde X_{C7} puede ser, por ejemplo, T o Q;
 En donde X_{C8} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente T o S;
 En donde X_{C9} puede ser, por ejemplo, Q o E;

En donde X_{C10} puede ser, por ejemplo, P o F;
 En donde X_{C11} puede ser, por ejemplo, F o L;
 En donde X_{C12} puede ser, por ejemplo, A o G;
 En donde X_{C13} puede ser, por ejemplo, T o I;
 5 En donde X_{C14} puede ser, por ejemplo, Q o A;
 En donde X_{C15} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente I o L, y; en donde X_{C16} puede ser, por ejemplo, un aminoácido básico o más particularmente K o R.

10 De acuerdo con una divulgación más específica, el anticuerpo 3C4 humanizado puede tener una región variable de cadena ligera de fórmula:

DIVMX_{c1}QSPSSX_{c2}X_{c3}ASX_{c4}GX_{c5}RVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{c6}PKTLI
 FRANRLVDGVPSPRFSGSGSGX_{c7}DYX_{c8}LTISLX_{c9}X_{c10}EDX_{c11}X_{c12}X_{c13}YSCLQYDEIPLTF
 GX_{c14}GTKLEX_{c15}X_{c16} (SEQ ID NO.:182);

15 En donde X_{c1} puede ser, por ejemplo, T o S;
 En donde X_{c2} puede ser, por ejemplo, L o M;
 En donde X_{c3} puede ser, por ejemplo, S o Y;
 En donde X_{c4} puede ser, por ejemplo, V o L;
 En donde X_{c5} puede ser, por ejemplo, D o E;
 20 En donde X_{c6} puede ser, por ejemplo, A o S;
 En donde X_{c7} puede ser, por ejemplo, T o Q;
 En donde X_{c8} puede ser, por ejemplo, T o S;
 En donde X_{c9} puede ser, por ejemplo, Q o E;
 En donde X_{c10} puede ser, por ejemplo, P o F;
 25 En donde X_{c11} puede ser, por ejemplo, F o L;
 En donde X_{c12} puede ser, por ejemplo, A o G;
 En donde X_{c13} puede ser, por ejemplo, T o I;
 En donde X_{c14} puede ser, por ejemplo, Q o A;
 En donde X_{c15} puede ser, por ejemplo, I o L y;
 30 en donde X_{c16} puede ser, por ejemplo, K o R.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo 3C4 humanizado puede tener una región variable de cadena pesada de fórmula:

EVQLQESGPXLVKPSQXLSLTCTVXGFSITSGYGWHWIRQXPGXXLEWXGYIN
 YDGHNDYNPSLKSRRXXIXQDTSKNQFXLXLXSVTXXDTAXYYCASSYDGLFAYWGQG
 TLVTVSX (SEQ ID NO.:183);

35 en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 26. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

40 De acuerdo con una divulgación más específica, el anticuerpo 3C4 humanizado puede tener una región variable de cadena pesada de fórmula:

EVQLQESGPX_{D1}LVKPSQX_{D2}L_{D3}SLTCTVX_{D3}GFSITSGYGWHWIRQX_{D4}PGX_{D5}X_{D6}L
 EWX_{D7}GYINYDGHNDYNPSLKSRRX_{D8}X_{D9}IX_{D10}QDTSKNQFX_{D11}LX_{D12}LX_{D13}SVTX_{D14}X_{D15}D
 TAX_{D16}YYCASSYDGLFAYWGQGLVTVSX_{D17} (SEQ ID NO.:184);

45 En donde X_{D1} puede ser, por ejemplo, G o D;
 En donde X_{D2} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente T o S;
 En donde X_{D3} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente S o T;
 En donde X_{D4} puede ser, por ejemplo, H o F;
 En donde X_{D5} puede ser, por ejemplo, K o N;
 50 En donde X_{D6} puede ser, por ejemplo, G o K;
 En donde X_{D7} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente I o M;
 En donde X_{D8} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo o más particularmente V o I;
 En donde X_{D9} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente T o S;

- En donde X_{D10} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente S o T;
 En donde X_{D11} puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófilo neutro o más particularmente S o F;
 En donde X_{D12} puede ser, por ejemplo, un aminoácido básico o más particularmente K o Q;
 En donde X_{D13} puede ser, por ejemplo, S o N;
 5 En donde X_{D14} puede ser, por ejemplo, A o T;
 En donde X_{D15} puede ser, por ejemplo, A o E;
 En donde X_{D16} puede ser, por ejemplo, V o T y;
 En donde X_{D17} puede ser cualquier aminoácido, A o ausente.
- 10 De acuerdo con una divulgación más específica, el anticuerpo 3C4 humanizado puede tener una región variable de cadena pesada de fórmula:

EVQLQESGPX_{d1}LVKPSQX_{d2}LSLTCTVX_{d3}**GFSITSGYGWHWIRQX_{d4}PGX_{d5}X_{d6}LE**
 WX_{d7}GYINYDGHNDYNPSLKSXR_{d8}X_{d9}IX_{d10}QDTSKNQFX_{d11}LX_{d12}LX_{d13}SVTX_{d14}X_{d15}DTAX
 d16YYCASSYDGLFAYWGQGLTVTSX_{d17} (SEQ ID NO.:185);

- 15 En donde X_{d1} puede ser, por ejemplo, G o D;
 En donde X_{d2} puede ser, por ejemplo, T o S;
 En donde X_{d3} puede ser, por ejemplo, S o T;
 En donde X_{d4} puede ser, por ejemplo, H o F;
 En donde X_{d5} puede ser, por ejemplo, K o N;
 20 En donde X_{d6} puede ser, por ejemplo, G o K;
 En donde X_{d7} puede ser, por ejemplo, I o M;
 En donde X_{d8} puede ser, por ejemplo, V o I;
 En donde X_{d9} puede ser, por ejemplo, T o S;
 En donde X_{d10} puede ser, por ejemplo, S o T;
 25 En donde X_{d11} puede ser, por ejemplo, S o F;
 En donde X_{d12} puede ser, por ejemplo, K o Q;
 En donde X_{d13} puede ser, por ejemplo, S o N;
 En donde X_{d14} puede ser, por ejemplo, A o T;
 En donde X_{d15} puede ser, por ejemplo, A o E;
 30 En donde X_{d16} puede ser, por ejemplo, V o T y;
 En donde X_{d17}, A o ausente.

En consecuencia, en el presente documento se divulga un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo capaz de unirse específicamente al antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1) que puede tener una región variable de
 35 cadena ligera al menos un 70% idéntica a la SEQ ID NO: 16 y/o una región variable de cadena pesada al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO: 18. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18.

En el presente documento también se divulga un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que puede tener una región variable de cadena ligera al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO: 24 y/o una región variable de
 40 cadena pesada al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO:26. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 24 o la SEQ ID NO: 26.

La presente invención también proporciona en otra realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la invención que puede tener una región variable de cadena ligera al menos el
 45 70% idéntica a la SEQ ID NO: 48 y/o una región variable de cadena pesada al menos el 70% idéntica a la SEQ ID NO: 46. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 48 o la SEQ ID NO: 46.

De acuerdo con una realización de la invención, la sustitución de aminoácidos está fuera de una región determinante de la complementariedad (CDR). Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene dicha una secuencia de
 50 aminoácidos engloba, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "de uno a veinticinco" incluye todos los valores individuales e intervalos, tal como por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 25; 1 a 25; 1 a 24, 1 a 23, 1 a 22, 1 a 21, 1 a 20, 1 a 19; 1 a 18; 1 a
 55 17; 1 a 16; 1 a 15 y así sucesivamente; 2 a 25, 2 a 24, 2 a 23, 2 a 22, 2 a 21, 2 a 20; 2 a 19; 2 a 18; 2 a 17 y así sucesivamente; 3 a 25, 3 a 24, 3 a 23, 3 a 22, 3 a 21, 3 a 20; 3 a 19; 3 a 18 y así sucesivamente; 4 a 25, 4 a 24, 4 a 23, 4 a 22, 4 a 21, 4 a 20; 4 a 19; 4 a 18; 4 a 17; 4 a 16 y así sucesivamente; 5 a 25, 5 a 24, 5 a 23, 5 a 22, 5 a 21, 5
 60 a 20; 5 a 19; 5 a 18; 5 a 17 y así sucesivamente, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "de uno a veintitrés" incluye todos los valores individuales e

intervalos, tal como por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 23; 1 a 23, 1 a 22, 1 a 21, 1 a 20, 1 a 19; 1 a 18; 1 a 17; 1 a 16; 1 a 15 y así sucesivamente; 2 a 23, 2 a 22, 2 a 21, 2 a 20; 2 a 19; 2 a 18; 2 a 17 y así sucesivamente; 3 a 23, 3 a 22, 3 a 21, 3 a 20; 3 a 19; 3 a 18 y así sucesivamente; 4 a 23, 4 a 22, 4 a 21, 4 a 20; 4 a 19; 4 a 18; 4 a 17; 4 a 16 y así sucesivamente; 5 a 25, 5 a 24, 5 a 23, 5 a 22, 5 a 21, 5 a 20; 5 a 19; 5 a 18; 5 a 17 y así sucesivamente, etc.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "de uno a veinte" incluye todos los valores individuales e intervalos, tal como por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 20; 1 a 20; 1 a 19; 1 a 18; 1 a 17; 1 a 16; 1 a 15 y así sucesivamente; 2 a 20; 2 a 19; 2 a 18; 2 a 17 y así sucesivamente; 3 a 20; 3 a 19; 3 a 18 y así sucesivamente; 4 a 20; 4 a 19; 4 a 18; 4 a 17; 4 a 16 y así sucesivamente; 5 a 20; 5 a 19; 5 a 18; 5 a 17 y así sucesivamente, etc.

10 Asimismo, la expresión "de uno a quince" incluye todos los valores individuales e intervalos, tal como por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 15; 1 a 15; 1 a 14; 1 a 13; 1 a 12; 1 a 11; 1 a 10 y así sucesivamente; 2 a 15; 2 a 14; 2 a 13; 2 a 12 y así sucesivamente; 3 a 15; 3 a 14; 3 a 13 y así sucesivamente; 4 a 15; 4 a 14; 4 a 13; 4 a 12; 4 a 11 y así sucesivamente; 5 a 15; 5 a 14; 5 a 13; 5 a 12 y así sucesivamente, etc.

15 Asimismo, la expresión "de uno a once" incluye todos los valores individuales e intervalos, tal como por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 11; 1 a 11; 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, y así sucesivamente; 2 a 11; 2 a 10; 2 a 9; 2 a 8 y así sucesivamente; 3 a 11; 3 a 10; 3 a 9 y así sucesivamente; 4 a 11; 4 a 10; 4 a 9; 4 a 8; 4 a 7 y así sucesivamente; 5 a 11; 5 a 10; 5 a 9; 5 a 8 y así sucesivamente, etc.

20 En una divulgación más específica, el número de sustituciones de aminoácidos que pueden acomodarse en una región variable de cadena ligera humanizada derivada de la SEQ ID NO: 16 puede ser, por ejemplo, de 1 a 15 sustituciones de aminoácidos.

25 En aún una divulgación más específica, el número de sustituciones de aminoácidos que pueden acomodarse en una región variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 18 puede ser, por ejemplo, de 1 a 20 sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, cuando se considera una versión humanizada de la SEQ ID NO: 18, puede ser útil tener al menos tres sustituciones de aminoácidos.

30 En otra divulgación más específica, el número de sustituciones de aminoácidos que pueden acomodarse en una región variable de cadena ligera humanizada derivada de la SEQ ID NO: 24 puede ser, por ejemplo, de 1 a 16 sustituciones de aminoácidos.

35 En aún una divulgación más específica adicional, el número de sustituciones de aminoácidos que pueden acomodarse en una región variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 26 puede ser, por ejemplo, de 1 a 17 sustituciones de aminoácidos.

40 En una realización más específica adicional de la invención, el número de sustituciones de aminoácidos que pueden acomodarse en una región variable de cadena ligera humanizada derivada de la SEQ ID NO: 48 puede ser, por ejemplo, de 1 a 11 sustituciones de aminoácidos.

45 En aún una realización específica adicional de la invención, el número de sustituciones de aminoácidos que pueden acomodarse en una región variable de cadena pesada humanizada derivada de la SEQ ID NO: 46 puede ser, por ejemplo, de 1 a 23 sustituciones de aminoácidos.

De acuerdo con una realización de la invención, las una a veinte sustituciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, en la región variable de cadena ligera.

50 De acuerdo con una realización de la invención, las una a veinte sustituciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, en la región variable de cadena pesada.

55 Por lo tanto, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado puede tener una región variable de cadena ligera que tiene hasta veinte sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 24 y puede tener una región variable de cadena pesada que tiene hasta veinte sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 26. Por lo tanto, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado puede tener una región variable de cadena ligera que tiene hasta veinticinco sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 48 y puede tener una región variable de cadena pesada que tiene hasta veinticinco sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 46.

60 Debe entenderse en el presente documento que cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado tiene dos regiones variables de cadena ligera y dos regiones variables de cadena pesada, cada una de las regiones variables de la cadena ligera puede tener independientemente hasta veinticinco, veinticuatro, veintitrés, veintidós, veintiuno, veinte, diecinueve, dieciocho, diecisiete, dieciséis, quince, catorce, trece, doce, once, diez, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos, una sustitución de aminoácidos y cada una de las regiones variables de cadena pesada pueden tener hasta veinticinco, veinticuatro, veintitrés, veintidós, veintiuno, veinte, diecinueve, dieciocho, diecisiete, dieciséis, quince, catorce, trece, doce, once, diez, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos, una

sustitución de aminoácidos.

Como se analiza en el presente documento, las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas. En una realización a modo de ejemplo, las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas.

5 Debe entenderse, en el presente documento, que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado divulgado en el presente documento también puede tener una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada que muestre una delección en comparación con la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:24 y/o SEQ ID NO:26. Debe
10 entenderse, en el presente documento que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado para su uso de acuerdo con la invención también puede tener una región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada que muestra una delección en comparación con la SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 y/o SEQ ID NO:197. Dicha delección se puede encontrar, por ejemplo, en un extremo amino o carboxi de la región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada.

15 Otra realización a modo de ejemplo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado para su uso de acuerdo con la presente invención incluye, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189 o SEQ ID NO:190.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 186" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, o al menos 112 aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 186" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en
25 la SEQ ID NO: 186 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 186, tales como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 108, 5 a 109, 13 a 103, 14 a 111 de la SEQ ID NO: 186 y así sucesivamente.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 187" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, o al menos 112 aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 187" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 187 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 187, tales como,
35 por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 7 a 109, 12 a 104, 22 a 113, 18 a 112 de la SEQ ID NO:187 y así sucesivamente.

Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO.:188", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:189" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:190" tienen un significado similar.

40 En conformidad con la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden tener, por ejemplo, una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 189 o 190.

45 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado para su uso de acuerdo con la presente invención incluye (o incluye adicionalmente), por ejemplo, una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 191, 192, 193, 194, 195, 196 o 197.

50 Como se usa en el presente documento, "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 191" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 o al menos 116 aminoácidos consecutivos". Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 191" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 191 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 191, tales como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 1 a 106, 2 a 112, 11 a 113, 7 a 102 de la SEQ ID NO:191 y así sucesivamente.

55 Como se usa en el presente documento, "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 192" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 o al menos 116 aminoácidos consecutivos". Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 192" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 192 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 192, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 109, 8 a 113, 1 a 102, 2 a 105 de la SEQ ID NO: 192 y así sucesivamente.

65 Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 193", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:194", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:195", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:196" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:197"

tienen un significado similar.

En conformidad con la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden tener, por ejemplo, una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 194, 195, 196 o 197.

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo,

a) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 186 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 o SEQ ID NO:197;

b) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 187 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 o SEQ ID NO:197;

c) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 188 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 o SEQ ID NO:197;

d) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 189 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO: 196 o SEQ ID NO: 197 o

e) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 190 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 o SEQ ID NO:197.

De acuerdo con una realización más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 189 o 190 y la región variable de cadena pesada puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de las SEQ ID NO:194, 195, 196 o 197.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 194.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 195.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 196.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 189 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 197.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 194.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 195.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 196.

En aún una realización aún más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser como se

establece en la SEQ ID NO: 190 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 197.

5 Otro ejemplo de anticuerpo y fragmento de unión a antígeno humanizados de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:176 o SEQ ID NO:168.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 174" también incluye las expresiones "al menos 91,92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o al menos 113 aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 174" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 174 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 174, tales como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 108, 5 a 109, 13 a 103, 14 a 111 de la SEQ ID NO: 174 y así sucesivamente.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 175" también incluye las expresiones "al menos 91,92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o al menos 113 aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 175" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 175 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 175, tales como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 7 a 109, 12 a 104, 22 a 113, 18 a 112 de la SEQ ID NO:175 y así sucesivamente.

20 Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:176" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:168" tienen un significado similar.

25 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden tener, por ejemplo, una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 168.

30 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado de la presente divulgación incluye (o incluye adicionalmente), por ejemplo, una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 177, 178, 179 o 169.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 177" también incluye las expresiones "al menos 91,92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o al menos 113 aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 177" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 177 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 177, tales como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 1 a 106, 2 a 112, 11 a 113, 7 a 102 de la SEQ ID NO:177 y así sucesivamente.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 178" también incluye las expresiones "al menos 91,92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o al menos 113 aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 178" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 178 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 178, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 109, 8 a 113, 1 a 102, 2 a 105 de la SEQ ID NO: 178 y así sucesivamente.

45 Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:179" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:169" tienen un significado similar.

50 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden tener, por ejemplo, una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 169.

55 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo,

60 f) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 174 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:179 o SEQ ID NO:169;

65 g) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 175 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:179 o SEQ ID NO:169;

h) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 176 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO: 179 o SEQ ID NO: 169 o;

5 i) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 168 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:179 o SEQ ID NO:169.

10 De acuerdo con una divulgación más específica, la región variable de cadena ligera puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 168 y la región variable de cadena pesada puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de las SEQ ID NO:169.

15 De acuerdo con una divulgación aún más específica, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 168 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 169.

20 Otros ejemplos de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno humanizados de la presente divulgación son aquellos que pueden comprender una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 180, 181, 182 o 172.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 180" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, o al menos 107, aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 180" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 180 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 180, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 102, 11 a 106, 1 a 106, 3 a 95, 5 a 95 de la SEQ ID NO: 180 y así sucesivamente.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 181" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, o al menos 107, aminoácidos consecutivos". La expresión "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 181" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 181 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 181, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 9 a 106, 10 a 101, 1 a 98, 3 a 99, 7 a 107 de la SEQ ID NO: 181 y así sucesivamente.

35 Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:182" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:172" tienen un significado similar.

40 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden tener, por ejemplo, una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 172.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado de la presente divulgación incluye (o incluye adicionalmente), por ejemplo, una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 183, 184, 185 o 173.

45 Como se usa en el presente documento, "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 183" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 o al menos 116 aminoácidos consecutivos". Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 183" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 183 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 183, tales como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 111, 1 a 106, 2 a 104, 5 a 106, 10 a 107 de la SEQ ID NO: 183 y así sucesivamente.

50 Como se usa en el presente documento, "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 185" también incluye las expresiones "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 o al menos 116 aminoácidos consecutivos". Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 185" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 185 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 185, tales como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 3 a 107, 1 a 115, 1 a 110, 22 a 116, 20 a 115 de la SEQ ID NO: 185 y así sucesivamente.

60 Las expresiones "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:184" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:173" tienen un significado similar.

65 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden tener, por ejemplo, una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 173.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo,

- 5 a) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 180 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185 o SEQ ID NO:173;
- 10 b) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 181 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185 o SEQ ID NO:173;
- 15 c) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 182 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO: 185 o SEQ ID NO: 173 o;
- d) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 172 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de la SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185 o SEQ ID NO:173.

20 De acuerdo con una divulgación más específica, la región variable de cadena ligera puede tener al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 172 y la región variable de cadena pesada puede tener al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:173.

25 De acuerdo con una divulgación aún más específica, la región variable de cadena ligera puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 172 y/o la región variable de cadena pesada puede ser como se establece en la SEQ ID NO: 173.

30 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede tener una región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada de acuerdo con la invención como se describe anteriormente y puede comprender además aminoácidos de una región constante, tales como, por ejemplo, aminoácidos de una región constante de un anticuerpo humano.

35 En una realización a modo de ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, una región constante de IgG1 humana.

De acuerdo con otra realización a modo de ejemplo de la invención, el fragmento de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un scFv, un Fab, un Fab' o un (Fab')₂.

Producción de los anticuerpos en células

40 Los anticuerpos anti-KAAG1 que se divulgan en el presente documento pueden prepararse mediante varios métodos familiares para aquellos expertos en la materia, tales como la metodología de hibridoma o mediante métodos de ADN recombinante.

45 Los anticuerpos anti-KAAG1 pueden producirse mediante la tecnología de hibridoma convencional, donde un ratón se inmuniza con un antígeno, se aíslan células de bazo y se fusionan con células de mieloma que carecen de expresión de HGPRT y las células híbridas se seleccionan mediante medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timina (HAT).

Los anticuerpos anti-KAAG1 pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante.

50 Con el fin de expresar los anticuerpos anti-KAAG1, las secuencias de nucleótidos capaces de codificar cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento o cualquier otra pueden insertarse en un vector de expresión, es decir, un vector que contiene los elementos para el control transcripcional y de traducción de la secuencia codificante insertada en un hospedador particular. Estos elementos pueden incluir secuencias reguladoras, tal como potenciadores, promotores constitutivos e inducibles, y regiones no traducidas 5' y 3'. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir tales vectores de expresión. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

60 Se puede utilizar varios sistemas de vector de expresión/célula hospedadora conocidos por aquellos expertos en la materia para expresar un polipéptido o ARN derivado de secuencias de nucleótidos capaces de codificar cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento. Estos incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, vectores de expresión de ADN plásmidos o cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectados con vectores de baculovirus; sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión virales o bacterianos; o sistemas de células animales. Para la producción a largo plazo de proteínas recombinantes en sistemas de mamíferos, puede efectuarse una expresión estable en líneas celulares. Por

ejemplo, las secuencias de nucleótidos capaces de codificar cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento pueden transformarse en líneas celulares utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador visible o seleccionable en el mismo o en un vector separado. La invención no está limitada por el vector o la célula hospedadora empleados. En determinados ejemplos, las secuencias de nucleótidos capaces de codificar cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento pueden unirse cada una en un vector de expresión separado y cada cadena expresarse por separado. En otro ejemplo, tanto las cadenas ligeras como las pesadas capaces de codificar cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento pueden unirse en un único vector de expresión y expresarse simultáneamente.

De manera alternativa, el ARN y/o el polipéptido pueden expresarse a partir de un vector que comprende secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento utilizando un sistema de transcripción *in vitro* o un sistema de transcripción/traducción acoplado *in vitro*, respectivamente.

En general, las células hospedadoras que contienen secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento y/o que expresan un polipéptido codificado por las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento, o una parte de las mismas, pueden identificarse mediante varios procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, aunque sin limitación, hibridaciones ADN/ADN o ADN/ARN, amplificación por PCR y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas que incluyen tecnologías basadas en membrana, solución o chip para la detección y/o cuantificación de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Los métodos inmunológicos para detectar y medir la expresión de polipéptidos usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos son conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales técnicas incluyen ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los expertos en la materia pueden adaptar fácilmente estas metodologías a la presente invención.

Las células hospedadoras que comprenden secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento pueden cultivarse en condiciones para la transcripción del correspondiente ARN (ARNm, ARNip, ARNhc, etc.) y/o la expresión del polipéptido a partir del cultivo de células. El polipéptido producido por una célula puede secretarse o retenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizado. En una divulgación a modo de ejemplo, los vectores de expresión que contienen secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento pueden diseñarse para que contengan secuencias señal que dirijan la secreción del polipéptido a través de una membrana celular procariótica o eucariótica.

Debido a la degeneración intrínseca del código genético, otras secuencias de ADN que codifican la misma secuencia de aminoácidos, sustancialmente la misma o funcionalmente equivalente pueden producirse y usarse, por ejemplo, para expresar un polipéptido codificado por secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas descritas en el presente documento. Las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento pueden diseñarse utilizando métodos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias de nucleótidos para varios propósitos que incluyen, pero sin limitación, la modificación de la clonación, procesamiento y/o expresión del producto génico. El reordenamiento del ADN por fragmentación aleatoria y el reensamblaje por PCR de fragmentos de genes y oligonucleótidos sintéticos se pueden usar para diseñar las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos se puede usar para introducir mutaciones que crean nuevos sitios de restricción, alteran los patrones de glicosilación, cambian la preferencia de codones, producen variantes de corte y empalme, etc.

Además, puede elegirse una cepa de células hospedadoras por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el polipéptido expresado de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, aunque sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. En una realización a modo de ejemplo, pueden desearse anticuerpos anti-KAAG1 que contengan estructuras o patrones de glicosilación particulares. El procesamiento postraducciona, que escinde una forma "prepro" del polipéptido, también se puede usar para especificar el direccionamiento, el plegamiento y/o la actividad de las proteínas. Diferentes células hospedadoras que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para actividades postraduccionales (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138) están disponibles comercialmente y a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y pueden elegirse para asegurar la modificación y el procesamiento correctos del polipéptido expresado.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que las secuencias de ácidos nucleicos naturales, modificadas o recombinantes pueden unirse a una secuencia heteróloga que da como resultado la traducción de un polipéptido de fusión que contiene restos de polipéptidos heterólogos en cualquiera de los sistemas hospedadores mencionados anteriormente. Dichos restos de polipéptidos heterólogos pueden facilitar la purificación de polipéptidos de fusión usando matrices de afinidad disponibles comercialmente. Dichos restos incluyen, aunque sin limitación, glutatión-S-

transferasa (GST), proteína de unión a maltosa, tiorredoxina, péptido de unión a calmodulina, 6-His (His), FLAG, c-myc, hemaglutinina (HA) y epítopos de anticuerpos tales como epítopos de anticuerpos monoclonales.

5 En el presente documento también se divulga un polinucleótido que puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender un compañero de fusión (por ejemplo, HA, Fc, etc.) fusionado al polipéptido (por ejemplo, la cadena ligera completa, la cadena pesada completa, las regiones variables, CDR, etc.) descritas en el presente documento.

10 Los expertos en la materia también reconocerán fácilmente que las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos pueden sintetizarse, total o parcialmente, utilizando métodos químicos o enzimáticos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la síntesis de péptidos se puede realizar utilizando varias técnicas en fase sólida y se pueden usar máquinas tales como el sintetizador de péptidos ABI 431A (PE Biosystems) para automatizar la síntesis. Si se desea, la secuencia de aminoácidos puede alterarse durante la síntesis y/o combinarse con secuencias de otras proteínas para producir una proteína variante.

15 Conjugados de anticuerpos

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento puede conjugarse con un resto detectable (es decir, con fines de detección o diagnóstico) o con un resto terapéutico (con fines terapéuticos). De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con un resto terapéutico (para fines terapéuticos).

25 Un "resto detectable" es un resto detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos y otros medios físicos. Un resto detectable puede acoplarse directa y/o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlace, tal como, sin limitación, un enlace DOTA o NHS) a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención usando métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse una amplia variedad de restos detectables, con la elección que depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación, los requisitos de estabilidad y la instrumentación disponible. Un resto detectable adecuado incluye, pero sin limitación, una un marcador fluorescente, un marcador radiactivo (por ejemplo, sin limitación, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹³¹I e incluye isótopos emisores de positrones para escáner PET, etc.), un marcador activo de resonancia magnética nuclear, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador cromóforo, un marcador enzimático (por ejemplo y sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), puntos cuánticos y/o una nanopartícula. El resto detectable puede causar y/o producir una señal detectable, permitiendo así que se detecte una señal a partir del resto detectable.

35 En otra realización a modo de ejemplo de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede acoplarse (modificarse) con un resto terapéutico (por ejemplo, fármaco, resto citotóxico).

40 En una realización a modo de ejemplo, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno anti-KAAG1 pueden comprender un inhibidor, un agente quimioterapéutico o citotóxico. Por ejemplo, el anticuerpo y los fragmentos de unión a antígeno pueden conjugarse con el agente quimioterapéutico o citotóxico. Tales agentes quimioterapéuticos o citotóxicos incluyen, aunque sin limitación, itrio-90, escandio-47, renio-186, yodo-131, yodo-125, y muchos otros reconocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, lutecio (por ejemplo, Lu¹⁷⁷), bismuto (por ejemplo, Bi²¹³), cobre (e.g., Cu⁶⁷)). En otros ejemplos, el agente quimioterapéutico o citotóxico puede comprender, sin limitación, 5-fluorouracilo, adriamicina, irinotecán, compuestos basados en platino tales como cisplatino y compuestos antitubulina o antimetabólicos tales como, taxanos, doxorubicina y ciclofosfamida, endotoxina de pseudomonas, ricina y otras toxinas. Los conjugados farmacológicos de anticuerpos adecuados se seleccionan entre los que tienen un CI₅₀ en el intervalo de 0,001 nM a 150 nM, 0,001 nM a 100 nM, 0,001 nM a 50 nM, 0,001 nM a 20 nM o 0,001 nM a 10 nM (inclusive). El fármaco citotóxico utilizado para la conjugación se selecciona, así, de acuerdo con estos criterios.

50 De manera alternativa, para llevar a cabo los usos terapéuticos de la presente invención y como se conoce en la técnica, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención (conjugado) se puede usar en combinación con una segunda molécula (por ejemplo, un anticuerpo secundario, etc.) que es capaz de unirse específicamente al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención y que puede llevar un resto detectable, de diagnóstico o terapéutico deseable.

55 Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos y su uso

Las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anti-KAAG1 (conjugados o no) también se divulgan en el presente documento. La composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno anti-KAAG1 y también puede contener un transportador farmacéuticamente aceptable.

Otras divulgaciones se refieren a una composición que puede comprender el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento y un transportador.

65 La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que puede comprender el anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Además de los principios activos, una composición farmacéutica puede contener transportadores farmacéuticamente aceptables que comprenden agua, PBS, soluciones salinas, gelatinas, aceites, alcoholes y otros excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. En otros ejemplos, se pueden esterilizar tales preparaciones.

Como se usa en el presente documento, "composición farmacéutica" significa cantidades terapéuticamente eficaces del agente junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes farmacéuticamente aceptables. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y régimen de administración dados. Dichas composiciones son líquidas o formulaciones liofilizadas o secas e incluyen diluyentes de varios contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en las superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares). Agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias formadoras de volumen o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), unión covalente de polímeros tales como el polietilenglicol a la proteína, formación de complejos con iones metálicos o incorporación del material en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares y multilamelares, eritrocitos fantasma o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulaciones en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). También se divulgan composiciones en partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas). Otras composiciones divulgadas incorporan revestimientos protectores en forma de partículas, inhibidores de la proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo las vías parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal, rectal. En un ejemplo, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, paracanceral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

Además, como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" o "transportador farmacéutico" son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, aunque sin limitación, tampón fosfato 0,01-0,1 M o 0,05 M o solución salina al 0,8 %. Adicionalmente, dichos transportadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los transportadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones alcohólicas acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, intercaladores, gases inertes y similares.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos de cultivos celulares o en modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros o cerdos. También se puede utilizar un modelo animal para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración. Dicha información se puede usar para determinar las dosis útiles y las vías de administración en seres humanos. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia y una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de principio activo que mejora los síntomas o la afección. La toxicidad y la eficacia terapéutica puede terminarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, tal como, calculando y contrastando las estadísticas de la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). Cualquiera de las composiciones terapéuticas descritas anteriormente puede aplicarse a cualquier sujeto que necesite tal terapia, incluyendo, pero sin limitación, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la presente invención pueden administrarse por cualquier número de vías que incluyen, pero sin limitación, medios orales, intravenosos, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, o rectales.

Métodos de uso

El término "tratamiento" para fines de la presente divulgación se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico dirigido. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se quiera prevenir el trastorno.

La presente divulgación proporciona un método para tratar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene cáncer de mama con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que es capaz de unirse específicamente a KAAG1.

En conformidad con la presente invención, el individuo puede tener un cáncer de mama que sea negativo para la expresión del receptor de estrógeno, la expresión del receptor de progesterona y/o la expresión de Her2 (o sobreexpresión).

5 También de acuerdo con la presente invención, el individuo puede tener un cáncer de mama que tiene una expresión baja para al menos uno entre receptor de estrógeno, receptor de progesterona y/o Her2.

10 Por ejemplo, el tumor puede ser negativo (o tener una expresión baja de) tanto la expresión del receptor de estrógeno como la expresión del receptor de progesterona.

En conformidad con la presente invención, el individuo puede tener un cáncer de mama que se caracteriza por ser triple negativo. El cáncer de mama puede ser de tipo basal.

15 En el presente documento también se divulga el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado descrito en el presente documento en el tratamiento o diagnóstico del cáncer de mama caracterizado por la falta de expresión del receptor de estrógeno, de expresión del receptor de progesterona y/o de sobreexpresión de Her2 o por baja expresión de al menos uno de estos tres marcadores.

20 En conformidad con la presente invención, el uso terapéutico puede comprender, por ejemplo, administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que sea capaz de unirse específicamente a KAAG1 de acuerdo con la presente invención a un individuo que lo necesite. El individuo que lo necesita se selecciona de preferentemente basándose en una falta de expresión de ER, expresión de PgR y/o ausencia de sobreexpresión de la proteína HER2. Las pruebas clínicas para estos marcadores se realizan generalmente utilizando métodos histopatológicos (inmunohistoquímica, FISH, etc.) y/o estudios de expresión génica (véase, por ejemplo, Dent et al, 2007, Bernstein y Lacey, 2011). El individuo que lo necesita puede, así, ser un individuo que ha recibido un diagnóstico de cáncer de mama triple negativo. El cáncer puede ser cáncer de mama de tipo basal.

30 La presente invención se refiere particularmente al tratamiento terapéutico de individuos con cáncer de mama triple negativo con un anticuerpo anti-KAAG1. El cáncer puede ser cáncer de tipo basal.

35 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno adecuados incluyen aquellos que son capaces de unirse específicamente a KAAG1 en la superficie de las células tumorales. Dichos anticuerpos pueden unirse preferentemente a un epítipo incluido dentro de los aminoácidos 30 a 84 de KAAG1 inclusive (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 36 a 60 (inclusive) o dentro de los aminoácidos 61 a 84 (inclusive) de KAAG1).

Los anticuerpos adecuados pueden ser aquellos que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y aquellos que se conjugan con un resto terapéutico.

40 En conformidad con la presente invención, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

El uso terapéutico de la presente invención puede incluir administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en combinación con un inhibidor, un agente quimioterapéutico o un agente citotóxico.

45 Otros métodos de tratamiento divulgados en el presente documento incluyen administrar otros tipos de inhibidores de KAAG1, tales como terapias basadas en antisentido (ARNip, antisentido, ribozimas, etc.).

50 En el presente documento se divulga un método para tratar cáncer de mama triple negativo o cáncer de mama de tipo basal mediante la administración de un inhibidor de la actividad o expresión de KAAG1 a un individuo que lo necesite.

55 El inhibidor de puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma. Más particularmente, el inhibidor de puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a los nucleótidos 738 a 992 (inclusive) de la SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma. Por ejemplo, el inhibidor puede incluir al menos 10 nucleótidos consecutivos (al menos 15, al menos 20) que sean complementarios de la SEQ ID NO: 1 o de los nucleótidos 738 a 992 (inclusive) de la SEQ ID NO: 1.

60 En ciertos casos, los anticuerpos y fragmentos anti-KAAG1 pueden interactuar con las células cancerosas que expresan KAAG1 e inducir una reacción inmunitaria al mediar la ADCC. En otros ejemplos, los anticuerpos y fragmentos anti-KAAG1 pueden bloquear la interacción de KAAG1 sus proteínas asociadas.

65 En ciertos casos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos anti-KAAG1 pueden administrarse simultáneamente con otros tratamientos administrados para la misma afección (agentes inhibidores, quimioterapéuticos o citotóxicos). Como tales, los anticuerpos pueden administrarse con un inhibidor de PARP1, un inhibidor de EGFR, antimetabólicos (por ejemplo, taxanos), agentes basados en platino (por ejemplo, cisplatino), agentes que dañan el ADN (por ejemplo, doxorubicina) y otras terapias contra el cáncer que son conocidos por los expertos

en la materia. En otros ejemplos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos anti-KAAG1 administrarse con otros anticuerpos terapéuticos. Estos incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos que se dirigen a EGFR, CD-20 y Her2.

- 5 En el presente documento se divulga un método para inhibir el crecimiento de células que expresan KAAG1 que son receptor de estrógeno negativas (ER-), receptor de progesterona negativas (PgR-) y/o que carecen de sobreexpresión de Her2 (Her2-), el método puede comprender poner en contacto las células con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento.
- 10 En el presente documento también se divulga un método para tratar cáncer o inhibir el crecimiento de células que expresan KAAG1 que son receptor de estrógeno negativas (ER-), receptor de progesterona negativas (PgR-) y/o que carecen de sobreexpresión de Her2 (Her2-), en un mamífero, el método puede comprender administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento a un mamífero que lo necesite.
- 15 La presente divulgación proporciona un método de tratamiento, métodos de diagnóstico y un método de detección utilizando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento y el uso de estos anticuerpos o fragmento de unión a antígeno en la fabricación de una composición farmacéutica o fármaco para tales fines.
- 20 El método de tratamiento descrito en el presente documento incluye administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento a un mamífero que lo necesita, y especialmente a un paciente que tiene o es susceptible de tener un cáncer caracterizado por ser receptor de estrógeno negativo (ER-), receptor de progesterona negativo (PgR-) y/o que carece de sobreexpresión de Her2 (Her2-),
- 25 También se desvelan en el presente documento métodos para reducir la propagación del tumor, invasión del tumor, formación de tumor o para inducir la lisis del tumor, que puede comprender administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado a un mamífero que lo necesite.
- 30 En el presente documento se divulga el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado descrito en el presente documento en (la fabricación de una composición farmacéutica para) el tratamiento del cáncer, reducción de la propagación del tumor, invasión del tumor, formación del tumores o para inducir la lisis del tumor de células tumorales que expresan KAAG1 que son receptores de estrógeno negativas (ER-), receptores de progesterona negativas (PgR-) y/o que carecen de sobreexpresión de Her2 (Her2-).
- 35 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser más particularmente aplicable para tumores malignos que incluyen, por ejemplo, un tumor maligno que tiene la capacidad de metastatizar y/o células tumorales caracterizadas por un crecimiento independiente del anclaje. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno divulgado en el presente documento también se puede usar en el diagnóstico de cáncer. El diagnóstico de cáncer se puede realizar *in vivo* administrando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento a un mamífero que
- 40 tiene o se sospecha que tiene un cáncer. El diagnóstico también puede realizarse *ex vivo* poniendo en contacto una muestra obtenida del mamífero con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y determinando la presencia o ausencia de células (células tumorales) que expresan KAAG1 o una variante de KAAG1.
- 45 También se divulga un método para detectar cáncer o detectar células que expresan KAAG1 que son receptor de estrógeno negativas (ER-), receptor de progesterona negativas (PgR-) y/o que carecen de sobreexpresión de Her2 (Her2-), en un mamífero, el método puede comprender administrar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento a un mamífero que lo necesite.
- 50 También se divulga un método para detectar una célula que expresa KAAG1 o una variante de KAAG1, el método puede comprender poner en contacto la célula con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento y detectar un complejo formado por el anticuerpo y la célula que expresa KAAG1 o la variante de KAAG1. Realizaciones a modo de ejemplo de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno usados en métodos de detección son aquellos que son capaces de unirse a la región extracelular de KAAG1.
- 55 Otras realizaciones a modo de ejemplo de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno utilizados en los métodos de detección son aquellos que se unen a KAAG1 o a la variante de KAAG1 expresada en la superficie de las células tumorales que son receptor de estrógeno negativas (ER-), receptores de progesterona negativas (PgR-) y/o que carecen de sobreexpresión de Her2 (Her2-).
- 60 También se divulga un método para detectar KAAG1 (SEQ ID NO: 2), una variante de KAAG1 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 o una forma secretada de la forma circulante de KAAG1 o variante de KAAG1, el método puede comprender poner en contacto una célula que expresa KAAG1 o la variante de KAAG1 o una muestra (biopsia, suero, plasma, orina, etc.) que comprende o se sospecha que comprende KAAG1 o la variante de KAAG1 con el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento y medir la unión. La muestra puede proceder de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que puede tener cáncer (por ejemplo, cáncer de mama que se caracteriza por ser receptor de estrógeno negativo (ER-), receptor de progesterona negativo
- 65

(PgR-) y/o que carece de sobreexpresión de Her2 (Her2 -), tal como el cáncer de mama de tipo basal o el cáncer de mama triple negativo) o puede ser sospechoso de tener cáncer. La muestra puede ser una muestra de tejido obtenida del mamífero o un sobrenadante de cultivo celular.

5 La muestra puede ser una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de sangre o líquido ascítico del mamífero. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento puede detectar ventajosamente una forma secretada o circulante (que circula en sangre) de KAAG1.

10 El método puede comprender cuantificar el complejo formado por el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido a KAAG1 o a la variante de KAAG1.

La unión de un anticuerpo a un antígeno causará un aumento en el peso molecular esperado del antígeno. Por lo tanto, se produce un cambio físico en la unión específica del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el antígeno.

15 Dichos cambios pueden detectarse utilizando, por ejemplo, electroforesis seguida de transferencia Western y coloración del gel o transferencia, espectrometría de masas, HPLC junto con un ordenador o de otra manera. Los aparatos capaces de calcular un cambio en el peso molecular son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, Phosphorimager™.

20 Cuando el anticuerpo comprende, por ejemplo, un marcador detectable, el complejo antígeno-anticuerpo puede detectarse por la fluorescencia emitida por el marcador, la emisión de radiación del marcador, la actividad enzimática de un marcador provista de su sustrato o de otra manera.

25 La detección y/o medición de la unión entre un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno y un antígeno pueden realizarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. La unión entre un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno y un antígeno puede monitorizarse con un aparato capaz de detectar la señal emitida por el marcador detectable (emisión de radiación, fluorescencia, cambio de color, etc.). Dicho aparato proporciona datos que indican que se produjo la unión y también puede proporcionar una indicación sobre la cantidad de anticuerpo unido al antígeno. El aparato (generalmente acoplado con un ordenador) también puede ser capaz de calcular la diferencia entre una
30 señal de fondo (por ejemplo, la señal obtenida en ausencia de unión antígeno-anticuerpo) o el ruido de fondo y la señal obtenida en la unión específica anticuerpo-antígeno. Dichos aparatos pueden proporcionar, así, al usuario indicaciones y conclusiones sobre si se ha detectado o no el antígeno.

35 También se divulgan kits que pueden incluir uno o más envases que contienen uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento.

Ácidos nucleicos, vectores y células

40 Los anticuerpos generalmente se producen en células que permiten la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada expresadas en un vector o vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o la cadena pesada.

45 En el presente documento se divulgan ácidos nucleicos capaces de codificar cualquiera de las CDR, regiones variables de cadena ligera, regiones variables de cadena pesada, cadenas ligeras, cadenas pesadas descritas en el presente documento.

En el presente documento se divulga un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a KAAG1.

50 Los ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia (es decir, al menos el 75%, al menos el 80% de identidad de secuencia) con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 45 y 47, fragmentos (por ejemplo, de al menos 10, al menos 15, al menos 20 nucleótidos consecutivos) y complementos de los mismos.

55 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar especialmente una región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada de un anticuerpo que puede ser capaz de inducir la muerte (eliminación, destrucción, lisis) de células tumorales que expresan KAAG1 o la variante de KAAG1.

60 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar especialmente una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que puede ser capaz de reducir la propagación de células tumorales que expresan KAAG1 o la variante de KAAG1.

65 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar particularmente una región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada de un anticuerpo que puede ser capaz de disminuir o dificultar la formación de los tumores que expresan KAAG1 o la variante de KAAG1.

Los ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena ligera que comprende:

- 5 a. una secuencia CDRL1 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO:73;
- b. una secuencia CDRL2 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO:76, o;
- c. una secuencia CDRL3 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79.

10 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos dos CDR de una CDRL1, una CDRL2 o una CDRL3.

También de acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una región variable de cadena ligera que puede comprender una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3.

15 La presente divulgación también se refiere a un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada que comprende:

- 20 a. una secuencia CDRH1 que comprende la SEQ ID NO:80;
- b. una secuencia CDRH2 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:85, o;
- c. una secuencia CDRH3 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87 y SEQ ID NO:88.

25 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos dos CDR de una CDRH1, una CDRH2 o una CDRH3.

De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una región variable de cadena pesada que puede comprender una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3.

30 La presente divulgación también abarca ácidos nucleicos que codifican variantes de anticuerpos que tienen al menos una sustitución de aminoácidos conservativa.

35 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una CDR que comprende al menos una sustitución de aminoácidos conservativa.

De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una CDR que comprende al menos una sustitución de aminoácidos conservativa en al menos dos de las CDR.

40 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una CDR que comprende al menos una sustitución de aminoácidos conservativa en las 3 CDR.

De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una CDR que comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos una de las CDR.

45 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una CDR que comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos dos de las CDR.

50 De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una CDR que comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos conservativas en las 3 de las CDR.

55 En el presente documento se divulga un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera que tiene al menos el 70%, el 75 %, el 80% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:124 y SEQ ID NO:125.

60 En el presente documento también se divulga un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada que tiene al menos el 70%, el 75 %, el 80% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146 y SEQ ID NO:147.

65 También se desvela en el presente documento un vector que comprende los ácidos nucleicos desvelados en el

presente documento.

De acuerdo con la presente divulgación, el vector puede ser un vector de expresión.

5 El vector que contiene los elementos para el control transcripcional y de traducción de la secuencia codificante insertada en un hospedador particular es conocido en la técnica. Estos elementos pueden incluir secuencias reguladoras, tal como potenciadores, promotores constitutivos e inducibles, y regiones no traducidas 5' y 3'. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir tales vectores de expresión. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

En el presente documento se divulga una célula aislada que puede comprender el ácido nucleico descrito en el presente documento.

15 La célula aislada puede comprender un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera y un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada en vectores separados o en el mismo vector. La célula aislada también puede comprender un ácido nucleico que codifica una cadena ligera y un ácido nucleico que codifica una cadena pesada en vectores separados o en el mismo vector.

20 De acuerdo con la presente divulgación, la célula puede ser capaz de expresar, ensamblar y/o secretar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

También se divulga en el presente documento una célula que puede comprender y/o puede expresar el anticuerpo descrito en el presente documento.

25 De acuerdo con la presente divulgación, la célula puede comprender un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera y un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada.

30 La célula puede ser capaz de expresar, ensamblar y/o secretar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los ejemplos a continuación se presentan para dar una idea general adicional de los detalles la presente invención.

Ejemplos

35 **Ejemplo 1**

Este ejemplo divulga los métodos utilizados para convertir los Fab en anticuerpos monoclonales quiméricos IgG1 completos.

40 Aparte de la posibilidad de realizar estudios de interacción entre los Fab monoclonales y la proteína KAAG1, el uso de Fab puede limitarse con respecto a la realización de estudios significativos *in vitro* e *in vivo* para validar la función biológica del antígeno. Por lo tanto, fue necesario transferir las regiones variables de la cadena ligera y pesada contenidas en los Fab a los armazones de anticuerpos completos, para generar IgG1 quiméricas de ratón-humano. Los vectores de expresión para las cadenas de inmunoglobulina tanto ligeras como pesadas se construyeron de manera tal que i) las secuencias de péptidos señal bacterianas originales cadena arriba de los vectores de expresión de Fab se reemplazaron por péptidos señal de mamíferos y ii) las regiones constantes de cadena ligera y pesada en los anticuerpos de ratón se reemplazaron por regiones constantes humanas. Los métodos para lograr esta transferencia utilizaron técnicas convencionales de biología molecular que son familiares para aquellos expertos en la materia.

55 **Vector de expresión de cadena ligera-** se modificó un plásmido de expresión de mamífero existente, llamado pTTVH8G (Durocher et al., 2002), diseñado para ser utilizado en el sistema de transfección transitoria de 293E para albergar la región variable de la cadena ligera de ratón. La cadena ligera quimérica ratón-humano resultante contenía una región variable de ratón seguida del dominio constante kappa humano. La secuencia de ADNc que codifica el dominio constante kappa humano se amplificó por PCR con los cebadores OGS1773 y OGS1774 (SEQ ID NO: 55 y 56, respectivamente). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente para la región constante kappa humana se muestran en las SEQ ID NO: 57 y 58, respectivamente. El producto de PCR resultante de 321 pares de bases se unió en pTTVH8G inmediatamente cadena abajo de la secuencia del péptido señal de VEGF A humano (NM_003376). Esta etapa de clonación también posicionó sitios únicos de endonucleasas de restricción que permitieron el posicionamiento preciso de los ADNc que codifican las regiones variables de cadena ligera de ratón. La secuencia del plásmido de expresión final, denominada pTTVK1, se muestra en la SEQ ID NO:59. Basándose en las secuencias divulgadas en la Tabla 2, se diseñaron cebadores de PCR específicos para las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos 3D3, 3G10, 3C4 y 3A4 (SEQ ID NO: 15, 19, 23 y 47, respectivamente) que incorporaron, en su extremo 5', una secuencia idéntica a los últimos 20 pares de bases del péptido señal de VEGF A. Las secuencias de estos cebadores se muestran en las SEQ ID NO: 60, 61, 62 y 213. Se utilizó el mismo cebador

inverso para amplificar las tres regiones variables de cadena ligera de 3D3, 3G10 y 3C4, ya que los extremos 3'-terminales eran idénticos. Este cebador (SEQ ID NO:63) incorporó, en su extremo 3', una secuencia idéntica a los 20 primeros pares de bases del dominio constante kappa humano. El cebador, SEQ ID NO:214, se usó para amplificar la región variable de la cadena ligera de 3A4. Tanto los fragmentos de PCR como el pTTVK1 digerido se trataron con actividad 3' - 5' exonucleasa de la ADN polimerasa de T4, dando como resultado extremos complementarios que se unieron mediante emparejamiento. Las reacciones de emparejamiento se transformaron en *E. coli* competentes y los plásmidos de expresión se verificaron mediante secuenciación para garantizar que las regiones variables de cadena ligera de ratón se insertaran correctamente en el vector de expresión pTTVK1. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que el método utilizado para la construcción de los plásmidos de expresión de cadena ligera se aplica a todos los anticuerpos anti-KAAG1 contenidos en la biblioteca de Fab original.

Vector de expresión de cadena pesada- el vector de expresión que produjo las inmunoglobulinas de cadena pesada se diseñó de manera similar al pTTVK1 descrito anteriormente para la producción de inmunoglobulinas de cadena ligera. El plásmido pYD11 (Durocher et al., 2002), que contiene la secuencia del péptido señal de IgGK humana, así como las regiones CH2 y CH3 del dominio Fc humano de IgG1, se modificó uniendo la secuencia de ADNc que codifica la región CH1 constante humana. Los cebadores de PCR OGS1769 y OGS1770 (SEQ ID NO: 64 y 65), diseñados para contener sitios únicos de endonucleasas de restricción, se utilizaron para amplificar la región CH1 de IgG1 humana que contiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente mostradas en las SEQ ID NO: 66 y 67. Después de la unión del fragmento de 309 pares de bases de CH1 humana inmediatamente cadena abajo de la secuencia del péptido señal de IgGK, el plásmido modificado (SEQ ID NO.: 68) se denominó pYD15. Cuando una región variable de cadena pesada seleccionada se une a este vector, el plásmido resultante codifica una inmunoglobulina de cadena pesada de IgG1 completa con regiones constantes humanas. Basándose en las secuencias divulgadas en la Tabla 2, se diseñaron cebadores de PCR específicos para las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos 3D3, 3G10, 3C4 y 3A4 (SEQ ID NO: 17, 21, 25 y 45, respectivamente) que incorporaron, en su extremo 5', una secuencia idéntica a los últimos 20 pares de bases del péptido señal de IgGK. Las secuencias de estos cebadores se muestran en las SEQ ID NO: 69 (3D3 y 3G10 tienen la misma secuencia 5'-terminal), SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO:215 para 3A4. Se utilizó el mismo cebador inverso para amplificar las tres regiones variables de cadena pesada de 3D3, 3C4 y 3G10, ya que los extremos 3'-terminales eran idénticos. Este cebador (SEQ ID NO:71) incorporó, en su extremo 3', una secuencia idéntica a los 20 primeros pares de bases del dominio constante CH1 humano. Para la región variable de la cadena pesada de 3A4, se utilizó la SEQ ID NO: 216. Tanto los fragmentos de PCR como el pYD15 digerido se trataron con actividad 3' - 5' exonucleasa de la ADN polimerasa de T4, dando como resultado extremos complementarios que se unieron mediante emparejamiento. Las reacciones de emparejamiento se transformaron en *E. coli* competentes y los plásmidos de expresión se verificaron mediante secuenciación para garantizar que las regiones variables de cadena pesada de ratón se insertaran correctamente en el vector de expresión pYD15. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que el método utilizado para la construcción de los plásmidos de expresión de cadena pesada se aplica a todos los anticuerpos anti-KAAG1 contenidos en la biblioteca de Fab original.

Expresión de las IgG1 humanas en células 293E- Los vectores de expresión preparados anteriormente que codificaban las inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada se expresaron en células 293E utilizando el sistema de transfección transitoria (Durocher et al., 2002). Se pueden usar otros métodos de expresión transitoria o estable. Se optimizó la proporción de cadena ligera a pesada a fin de lograr el mayor rendimiento del anticuerpo en el medio de cultivo tisular y se encontró que era 9: 1 (L: H). La capacidad de los anticuerpos anti-KAAG1 (monoclonales, quiméricos o humanizados) para unirse a Fc-KAAG1 recombinante se midió mediante ELISA y se comparó con los Fab de ratón originales.

El esquema utilizado para convertir otros Fab en una IgG completa (incluido el 3A4) y para la expresión de los anticuerpos se describe con más detalle en la solicitud internacional número PCT/CA2012/000296, cuyo contenido íntegro se incorpora al presente documento por referencia.

Ejemplo 2

Humanización del anticuerpo monoclonal 3A4 de ratón

Las patentes internacionales n.º PCT/CA2009/001586, PCT/CA2010/001795 y PCT/CA2012/000296, describen una metodología a modo de ejemplo utilizada para generar las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada humanizadas.

La humanización de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 3A4 implicó 11 mutaciones en su marco humanizado propuesto para un 100% de humanización del marco. La humanización de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 3A4 implicó 23 mutaciones en su marco humanizado propuesto para un 100% de humanización del marco. Estas secuencias de región variable humanizadas al 100% están marcadas como LvH1 y HvH1, respectivamente (SEQ ID NO: 189 y 194). También se diseñaron secuencias humanizadas adicionales en las que se conservaron varios restos de las secuencias de 3A4 de ratón basándose en cuidadosos análisis de secuencias estructurales y comparativas que indican una alta probabilidad de alterar la afinidad de unión a antígeno si se van a introducir mutaciones en estas posiciones. Estas secuencias de las regiones variables están marcadas como LvH2,

Hvh2, Hvh3 y Hvh4 (SEQ ID NO: 190, 195, 196 y 197).

Las dos variantes de cadena ligera humanizadas (incluida la región constante) se identifican en el presente documento, como Lh1 (SEQ ID NO: 199) y Lh2 (SEQ ID NO:200). Las cuatro variantes de cadena pesada humanizadas (incluida la región constante se identifican en el presente documento, como Hh1 (SEQ ID NO:202), Hh2 (SEQ ID NO:203), Hh3 (SEQ ID NO:204) y Hh4 (SEQ ID NO: 205). Las dos cadenas ligeras humanizadas y 4 cadenas pesadas humanizadas se pueden ensamblar en 8 anticuerpos humanizados (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3, Lh1Hh4, Lh2Hh1, Lh2Hh2, Lh2Hh3 y Lh2Hh4).

En el caso de la secuencia humanizada de la cadena ligera de 3A4 Lvh2 (SEQ ID NO: 190), los restos del marco Val-L2 y Lys-L45 se conservaron de la secuencia de ratón ya que el resto L2 está semiinternado, entra en contacto tanto con CDR-L1 como con CDR-L3, y tiene una propensión al contacto con el antígeno, mientras que el residuo L45 se acerca a la cadena pesada. Los presentes inventores notaron que estos dos restos murinos pueden producirse en marcos humanos. En el caso de la secuencia humanizada de la cadena pesada de 3A4 Hvh2 (SEQ ID NO: 195), los restos del marco Ile-H2 y Lys-L73 se conservaron de la secuencia de ratón ya que el resto H2 está semiinternado, entra en contacto tanto con CDR-H1 como con CDR-H3, y tiene una propensión al contacto con el antígeno, mientras que el resto H73 pertenece a la zona Vernier que soporta CDR-H2, y ambos restos murinos pueden aparecer en marcos humanos. En el caso de la secuencia humanizada de la cadena pesada de 3A4 Hvh3 (SEQ ID NO: 196), las mutaciones inversas Ile-H2 y Lys-L73 se conservaron y, además de estas, los restos del marco Ile-H48, Ala-H67, Leu-H69 y Val-H71 se conservaron de la secuencia de ratón ya que todos estos restos murinos adicionales son restos escondidos y pertenecen a la zona de Vernier que soporta CDR-H2, y también el resto H71 murino puede aparecer en marcos humanos. En el caso de la secuencia humanizada de la cadena pesada de 3A4 Hvh4 (SEQ ID NO: 197), se incluyeron las 6 mutaciones inversas de la variante humanizada de Hvh3 más dos restos adicionales de marco de ratón Lys-H38 y Lys-H66 ya que constituyen restos semiinternados cerca de CDR-H2. Las secuencias de aminoácidos resultantes de las cadenas murinas y humanizadas se enumeran en la Tabla 1. La alineación de las regiones variables de la cadena ligera murina y humanizada se muestra en la Figura 1a y la alineación de las regiones variables de la cadena pesada murina y humanizada se muestra en la Figura 1b.

Las Figuras 2a y 2b son una alineación de la región variable de la cadena ligera murina con la región variable de la cadena ligera humanizada al 100% y la región variable de la cadena pesada murina con la región variable de la cadena pesada humanizada del 100%, respectivamente. Esta figura ilustra los aminoácidos que se conservan y los que se han elegido para la sustitución.

Ejemplo 3.

Ensamblaje y expresión de anticuerpos variantes humanizados de 3A4

El propósito de estas investigaciones es determinar los parámetros cinéticos de los anticuerpos antiagregación. En particular, para determinar si la humanización del anticuerpo monoclonal 3A4 anti-KAAG1 afecta a los parámetros cinéticos de su unión a KAAG1 humano. Para este fin, se desarrolló un método de análisis cinético utilizando el instrumento ProteOn XPR36 de BioRad. Se inmovilizó KAAG1 humano en un chip sensor. Se inyectaron anticuerpos de longitud completa o fragmentos Fab y se les permitió interactuar con el KAAG1 inmovilizado.

Construcción del plásmido que codifica las cadenas pesadas y ligeras quiméricas (murinas) de 3A4

Las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo quimérico se amplificaron por PCR a partir de las cadenas de inmunoglobulinas murinas originales utilizando los siguientes pares de cebadores de oligonucleótidos: cadena pesada, 5'-oligo codificado por la SEQ ID NO: 206 y 3'-oligo codificado por la SEQ ID NO: 207; cadena ligera, 5'-oligo codificado por la SEQ ID NO: 208 y 3'-oligo codificado por la SEQ ID NO: 209. Los productos de PCR resultantes se digirieron con Hind III y se clonaron en pK-CR5 (SEQ ID NO: 210) previamente digeridos con Hind III.

Construcción de plásmidos que codifican la cadena pesada humanizada de las variantes 1, 2, 3 y 4 de 3A4

Los fragmentos que codifican la región de las cadenas pesadas humanizadas del anticuerpo 3A4 (Hh1, Hh2, Hh3 y Hh4) se encargaron de GenScript (Piscataway, EE. UU.). Los fragmentos de ADN que incluyen las secuencias kozak y de codón de parada se digirieron con HindIII y se clonaron en el sitio HindIII del plásmido pK-CR5 previamente desfosforilado con fosfatasa intestinal de ternera (NEB) para prevenir la recircularización. La Figura 3a muestra el mapa del plásmido pK-CR5-3A4-HC-variante1. Todas las variantes de cadena pesada del 3A4 humanizado se construyeron de manera similar.

Construcción de plásmidos que codifican la cadena ligera humanizada de las variantes 1 y 2 de 3A4

Los fragmentos que codifican las regiones de las cadenas ligeras humanas del anticuerpo 3A4 (Lh1 y Lh2) se encargaron de GenScript. Los fragmentos de ADN que incluyen las secuencias kozak y de codón de parada se digirieron con BamHI y se clonaron en el sitio BamHI del plásmido pMPG-CR5 (SEQ ID NO:211) previamente desfosforilado con fosfatasa intestinal de ternera (NEB) para prevenir la recircularización. La Figura 3b muestra el

mapa del plásmido pMPG-CR5-3A4-LC-variante1. Todas las variantes de cadena ligera del 3A4 humanizado se construyeron de manera similar.

Estudio de transfección transitoria

5 El ADN plasmídico se aisló de pequeños cultivos de *E. coli* utilizando el kit Mini-Prep (Qiagen Inc, Mississauga, ON) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Brevemente, se inocularon 2 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina con una única colonia seleccionada después de la ligación y transformación. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante la noche con agitación intensa (250 RPM). El plásmido se aisló, a continuación, de 1,5 ml de cultivo
10 utilizando los protocolos, tampones y columnas proporcionados por el kit. El ADN se eluyó utilizando 50 µl de agua estéril. El ADN plasmídico se aisló de cultivo grande de *E. coli* utilizando el kit Plasmid Plus Maxi (Qiagen Inc, Mississauga, ON) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Se inocularon 200 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina con una única colonia nueva de *E. coli* y se incubaron durante la noche a 37 °C con agitación
15 intensa (250 RPM). Las bacterias (130 ml de cultivo para la cadena pesada y 180 ml de cultivo para la cadena ligera) se sedimentaron por centrifugación a 6000 x g, durante 15 min, a 4 °C y el plásmido se aisló utilizando los protocolos, tampones y columnas proporcionados por el kit. Los plásmidos puros se resuspendieron en Tris 50 mM estéril, pH 8 y se cuantificaron midiendo la densidad óptica a 260 nm. Antes de la transfección, los plásmidos purificados se esterilizaron por extracción con fenol/cloroformo seguido de precipitación con etanol. Los plásmidos se resuspendieron en Tris 50 mM estéril, pH 8 y se cuantificaron por densidad óptica a 260 nm.

20 Antes de la transfección, las células (CHO-cTA) se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de $4,0 \times 10^6$ células/ml en medio de crecimiento (CD-CHO, Invitrogen) sin sulfato de dextrano durante 3 h en un cultivo en suspensión. Para cada combinación de plásmidos, se transfectaron 45 ml de células agregando lentamente 5 ml de medio CDCHO suplementado con 10 µg/ml de cada plásmido y 50 µg/ml de polietilenimina (PEI Max; Polysciences).
25 La concentración final fue de 1 µg/ml de cada plásmido y 5 µg/ml de PEI. Después de 2 h, Las células se transfirieron a 30 °C. Los siguientes días, se agregaron a las células 50 µg/ml de sulfato de dextrano y 3,75 ml de cada suplemento (Efficient Feed A y B de Invitrogén) y se incubaron a 30 °C durante 13 días. Se añadieron 2,5 ml de Feed A y 2,5 ml de Feed B en los días 4, 6, 8 y 11. En el día 13, el sobrenadante se aclaró por centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,22 µM.

30 Las células CHO (CHOcTA) se transfectaron con plásmidos que codifican las diferentes variantes de cadenas pesadas y ligeras humanizadas del anticuerpo 3A4 regulados por el promotor CR5. Se realizó transfección con diferentes combinaciones de cadenas ligeras y pesadas. Como control, las células también se transfectaron con plásmidos que codifican el anticuerpo quimérico/murino.

Purificación de anticuerpo

35 Se concentraron 15 ml de sobrenadante de las transfecciones de células CHO mediante centrifugación usando el casete Amicon Ultra (Ultracell-50k) a 1500 rpm. El anticuerpo concentrado (550 µl) se purificó utilizando el kit NAb Protein A Plus Spin (Thermo Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos purificados se desalaron, a continuación, utilizando PBS y el casete de concentración Amicon Ultra (Ultracel-10K) a 2500 rpm hasta un volumen final de 250 µl. El anticuerpo purificado se cuantificó leyendo la DO_{280} utilizando el espectrofotómetro Nanodrop y se mantuvo congelado a -20 °C. Una parte alícuota del anticuerpo purificado se resuspendió en un volumen igual de Laemmli 2X y se calentó a 95 °C durante 5 min y se enfrió en hielo. Se realizó
45 una curva estándar utilizando una cantidad conocida de kappa de IgG1 humana purificada del plasma de Mieloma Humano (Athens Research). Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida Novex Tris-glicina al 10% (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-N (Amersham Bioscience Corp., Baie d'Urfée, QC) durante 1 hora 275 mA. La membrana se bloqueó durante 1 h en Tween 20 al 0,15%, leche desnatada al 5% en PBS y se incubó durante 1 h con una anti IgG humana de cabra (H+L) conjugada con Cy5 (Jackson, número de Cat. 109-176-099). La señal se reveló y se cuantificó mediante el escaneo con el escáner Typhoon Trio+ (GE Healthcare). Como se muestra en la figura 4, todas las combinaciones de las variantes del anticuerpo humanizado 3A4 se expresaron en células CHO.

Ejemplo 4.

Análisis cinético del anticuerpo 3A4 murino y humanizado

Suministros

60 Los chips sensores GLM, el kit de acoplamiento de aminos Bio Rad ProteOn (EDC, NHS y etanolamina), y los tampones de acetato de sodio 10 mM se adquirieron de Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON). El tampón de HEPES, EDTA y NaCl se adquirieron de Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Se compró una solución de Tween 20 al diez por ciento de Teknova (Hollister, CA). El anticuerpo específico del fragmento Fc de anti IgG humana de cabra se adquirió de Jackson ImmunoResearch. La columna de filtración en gel Superdex 75 10/300 GL se adquirió de GE
65 Healthcare.

Filtración en gel

La proteína KAAG1 a una concentración de 3,114 mg/ml y un volumen de 220 μ l se inyectó en la columna Superdex G75. La separación se realizó a 0,4 ml/min en tampón de ejecución HBST (véase a continuación) sin Tween 20. El volumen de las fracciones recogidas fue de 500 μ l. La concentración de KAAG1 en cada fracción se determinó por DO₂₈₀ utilizando un coeficiente de extensión de 5500 y un PM de 8969. La Figura 5 representa el perfil de la filtración en gel de KAAG1. Un pequeño máximo de agregado potencial se eluye en alrededor de 11 ml. La proteína que eluye a 13 ml se usó como analito para el ensayo de SPR (fracciones 15-19).

10 *Ensayos de biosensores para SPR*

Todos los ensayos de resonancia de plasmón de superficie se realizaron utilizando un instrumento BioRad ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories Ltd. (Mississauga, ON) con tampón de ejecución HBST (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM y Tween 20 al 0,05%, pH 7,4) a una temperatura de 25 °C. La superficie de captura de anti Fc de ratón se generó usando un chip sensor GLM activado por una dilución 1:5 de las soluciones patrón BioRad sNHS/EDC inyectadas durante 300 s a 30 μ l/min en la dirección del analito (horizontal). Inmediatamente después de la activación, se inyectaron 13 μ g/ml de solución de un fragmento de Fc de anti IgG humana específico en NaOAc 10 mM, pH 4.5 en la dirección del analito a un caudal de 25 μ l/min hasta que se inmovilizaron aproximadamente 8000 unidades de resonancia (UR). Los grupos activos restantes se inactivaron mediante una inyección de 300 s de etanolamina 1M a 30 μ l/min en la dirección del analito, y esto también garantiza que los puntos de referencia activados de forma simulada se crean para la referencia en blanco. La selección de las variantes de 3A4 para unirse a KAAG1 se realizó en dos pasos: una captura indirecta de variantes de 3A4 del sobrenadante celular en la superficie específica del fragmento Fc de anti IgG humana en la dirección del ligando (vertical) seguida de una inyección de KAAG1 en la dirección del analito. En primer lugar, se usó una inyección de tampón durante 30 s a 100 μ l/min en la dirección del ligando para estabilizar el valor inicial. Para cada captura de 3A4, se diluyeron variantes de 3A4 no purificadas en medios de cultivo de células al 4% en HBST, o se utilizaron aproximadamente 1,25 μ g/ml de 3A4 purificado en HBST. Se inyectaron simultáneamente de cuatro a cinco variantes de 3A4 junto con 3A4 de tipo silvestre en canales de ligandos individuales durante 240 s a un flujo de 25 μ l/min. Esto dio como resultado una captura de saturación de 3A4 de aproximadamente 400-700 UR en la superficie específica del fragmento Fc de anti IgG humana. El primer canal de ligando se dejó vacío para utilizarlo como control en blanco, si fuera necesario. Esta etapa de captura de 3A4 se siguió inmediatamente por dos inyecciones de tampón en la dirección del analito para estabilizar el valor inicial, y, a continuación, se inyectó KAAG1 purificado por filtración en gel. Para una selección determinada, se inyectaron simultáneamente cinco concentraciones de KAAG1 (8, 2,66, 0,89, 0,29 y 0,098 nM) y tampón control en canales de analito individuales a 50 μ l/min durante 120 s con una fase de disociación de 600 s, dando como resultado un conjunto de sensogramas de unión con un tampón referencia para cada una de las variantes de 3A4 capturadas. Los complejos de fragmento Fc específico anti IgG humana-3A4 se regeneraron mediante un pulso de 18 s de ácido fosfórico al 0,85% durante 18 s a 100 μ l/min para preparar la superficie específica del fragmento Fc anti IgG humana para el siguiente ciclo de inyección. Los sensorgramas se alinearon y se hicieron doble referencia utilizando la inyección de tampón en blanco y los puntos de referencia y los sensogramas resultantes se analizaron utilizando el software ProteOn Manager v3.0. Los valores cinéticos y de afinidad se determinaron ajustando los sensogramas referidos al modelo de unión de Langmuir 1: 1 utilizando R_{max} local, y las constantes de afinidad (K M) se derivaron de las constantes de velocidad resultantes (k_d s⁻¹/ka M⁻¹s⁻¹).

Determinación de las constantes de velocidad y afinidad

La Figura 6 resume las constantes de velocidad de asociación (k_a , 1/Ms) y disociación (k_d , 1/s), así como las constantes de afinidad (K_D , M) para la interacción de KAAG1 con 3A4 murino purificado, 3A4 murino expresado de forma transitoria como quimérico y variantes humanizadas expresadas transitoriamente. Estas constantes se representan gráficamente en la Figura 7a-c. La constante de velocidad de asociación es muy similar para las variantes precursoras puras, quiméricas y humanizadas de 3A4 (Figura 7a). Las constantes de velocidad de disociación son similares para el quimérico de expresión transitoria en comparación con el 3A4 precursor puro, lo que sugiere que el procedimiento de transfección no alteró los parámetros de la interacción de KAAG1 con el anticuerpo (Figura 7b). Sin embargo, todas las variantes humanizadas parecen tener una constante de disociación ligeramente modificada, es decir, constante de disociación más rápida (Figura 7b). Esto se refleja en las constantes de afinidad (Figura 7c). En resumen, existe una correlación lineal entre la afinidad de unión ($\log K_D$) de la variante humanizada y el número de mutaciones inversas producidas en el anticuerpo precursor(LcHc) con una disminución en la afinidad de unión a medida que aumenta el número de mutaciones. Sin embargo, la diferencia en la afinidad de unión es solo 4 veces diferente entre la peor variante (H1L1, 0,47 nM) que no tiene ningún resto de ratón conservado y la mejor variante que tiene 10 restos de ratón conservados (H4L2, 0,1 nM). Por último, se encontró que la afinidad de unión de todas las variantes para KAAG1 es subnanomolar y la mejor variante (H4L2, 0,1 nM) mostró una afinidad aproximadamente 6 veces más débil que la murina (LcHc, 0,057 nM). En general, estos resultados indican que la humanización fue exitosa ya que todas las variantes mostraron una alta afinidad por KAAG1.

Ejemplo 5.**Unión de variantes humanizadas de 3A4 a KAAG1 en un ELISA**

Los métodos ELISA también se usaron para comparar la actividad de unión de las variantes humanizadas de 3A4 con el anticuerpo 3A4 murino. El KAAG1 humano recombinante se recubrió en placas de 96 pocillos O/N, se lavó y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con cantidades crecientes de variantes de 3A4 murinas o humanizadas.

5 Después de otra ronda de etapas de lavado, se añadió un anticuerpo antihumano conjugado a HRP a los pocillos y el anticuerpo 3A4 unido se midió calorimétricamente a Abs₄₅₀. Como se muestra en la Figura 8a, las variantes humanizadas (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3 and Lh1Hh4) mostraron una unión muy similar a KAAG1 en comparación con el 3A4 murino (LcHc), que tiene una alta afinidad de 0,016 nM. Este resultado indicó que las cuatro variantes de cadena pesada humanizadas a eran comparables a la cadena pesada de h3A4 original cuando se ensamblaban con la variante L1 de la cadena ligera humanizada. La Figura 8a muestra los resultados cuando las variantes de la cadena pesada se ensamblaron con la variante Lh2 de la cadena ligera humanizada de 3A4. En este caso, hubo una diferencia en la unión de las variantes. Por ejemplo, Lh2hh4 fue la variante con el perfil más cercano en comparación con el 3A4 murino. Esto estaba de acuerdo con los datos de SPR, que mostraron que la variante 4 de la cadena pesada tenía la mayor afinidad para KAAG1. Tomados en conjunto, estos resultados de unión muestran que todas las variantes humanizadas interactúan con KAAG1 humano en este ensayo. Aunque hubo algunas diferencias sutiles, la unión en ELISA estaba en concordancia con los resultados de SPR.

Ejemplo 6.

20 Unión de variantes humanizadas 3A4 sobre la superficie de las células cancerosas

La citometría de flujo se utilizó para evaluar la capacidad de las variantes humanizadas de 3A4 para interactuar con KAAG1 expresado en la superficie de las células cancerosas. Para este fin, células de cáncer de ovario SKOV-3, que los presentes inventores habían mostrado previamente que estaban unidas eficazmente por 3A4 mediante citometría de flujo, se incubaron con las ocho variantes humanizadas y el anticuerpo murino original. Brevemente, las células SKOV-3 se separaron de la placa con EDTA y se incubaron en hielo con 3,0 mg/ml, 0,3 mg/ml o 0,3 mg/ml de los anticuerpos durante 1 h. Después de tres etapas de lavado, las células se incubaron con el anticuerpo secundario, anti IgG humana conjugada a FITC durante 1 h en hielo. La fluorescencia de la superficie celular se midió en un citómetro de flujo y los valores se muestran en el histograma de la Figura 9. Como se representa, todas las variantes pudieron detectar KAAG1 sobre la superficie no permeabilizada y las señales más fuertes se obtuvieron a la concentración más alta de anticuerpos 3A4 (3 mg/ml) y disminuyeron a medida que disminuía la concentración del anticuerpo. Entre las diferentes variantes, las que tienen la mayoría de las mutaciones inversas murinas (Figura 9, véase Lh1Hh4 y Lh2Hh4) interactuaron con KAAG1 en la superficie de las células con la mayor actividad. De hecho, Lh1Hh4 y Lh2hh4 parecen tener una unión ligeramente mejorada de la superficie celular a KAAG1 en comparación con el anticuerpo murino 3A4 (LcHc).

Ejemplo 7

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti-KAAG1 para detectar la expresión de KAAG1 en TNBC.

40 Como un medio para determinar si el antígeno KAAG1 estaba presente en las muestras de TNBC, se realizó una inmunohistoquímica. Se obtuvieron micromatrices de tejido que contenían 139 muestras de tumores de mama generadas a partir de biopsias de pacientes. Las muestras de tumores de mama epiteliales embebidas en parafina se colocaron en portaobjetos de vidrio y se fijaron durante 15 minutos a 50 °C. La desparafinación se realizó tratando 45 2 veces con xileno seguido de deshidratación en lavados sucesivos de 5 min en etanol al 100%, al 80% y al 70%. Los portaobjetos se lavaron 3 veces en PBS durante 5 min y se trataron con una solución de recuperación de antígeno (EDTA 1 mM, pH 8,0) para desenmascarar el antígeno. Las especies reactivas al peróxido endógenas se eliminaron incubando portaobjetos con H₂O₂ en metanol y el bloqueo se realizó incubando los portaobjetos con solución de bloqueo sin suero (Santa Cruz Biotech) durante 5 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (3A4 anti-KAAG1) se añadió durante 1 hora a temperatura ambiente. El antígeno KAAG1 reactivo se detectó mediante incubación con un anti-kappa de ratón conjugado con biotina, seguido de un anticuerpo terciario estreptavidina-HRP. La tinción positiva se reveló al tratar los portaobjetos con sustrato de peróxido de hidrógeno DAB durante menos de 5 minutos y posteriormente se volvió a contrateñir con hematoxilina. Se encontró que la proteína KAAG1 se expresaba a niveles muy altos en la gran mayoría de las muestras de tumores de mama. En la Figura 10 se representa una matriz representativa que contiene 139 tumores. En particular, las muestras de biopsia 15/20 confirmadas como TNBC (Figura 10, muestras identificadas con un asterisco) se tiñeron fuertemente para la expresión de KAAG1 con el anticuerpo 3A4. Tomados en conjunto, estos estudios inmunohistoquímicos ilustran la utilidad de detectar KAAG1 en cáncer de mama, en particular en TNBC, con los anticuerpos monoclonales.

60 Ejemplo 8

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos anti-KAAG1 para detectar la expresión de KAAG1 en líneas celulares de TNBC.

65 Los resultados combinados del análisis bioinformático de la estructura primaria del ADNc que codifica KAAG1, los estudios bioquímicos y la detección inmunohistoquímica de la proteína en las células epiteliales sugirieron que el

antígeno KAAG1 estaba localizado en la superficie celular. Sin embargo, se requirió evidencia más directa para demostrar que KAAG1 se expresa de hecho en la superficie de las células de TNBC. Para realizar este análisis, se obtuvieron líneas celulares de cáncer de mama de un proveedor comercial (ATCC, Manassas, VA) y se usaron en experimentos de citometría de flujo. Los análisis de expresión de RT-PCR utilizando cebadores específicos de ARNm de KAAG1 mostraron previamente que ciertas líneas celulares de cáncer de mama expresaban ARNm de KAAG1 (véase PCT/CA2007/001134). Por lo tanto, algunas de estas líneas celulares se seleccionaron para determinar la presencia del antígeno KAAG1 en su superficie. Para verificar esto, las líneas celulares triple negativas MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT-20 y BT-549 se analizaron para determinar la expresión superficial de KAAG1 utilizando el anticuerpo 3A4 anti-KAAG1. Además, también se incluyeron en el análisis líneas celulares de cáncer de mama, que no son triple negativas, denominadas T47D y MCF-7. Por último, una línea celular de control, 293-6E, que exhibe un nivel indetectable de expresión de antígeno KAAG1 se incluyó como control negativo para el experimento de citometría de flujo (FCM). Para los fines del análisis de FCM, se recogieron las células utilizando EDTA 5 mM, contadas con un hemocitómetro y se resuspendieron en tampón de FCM (BSA al 0,5%, suero de cabra al 0,01% en PBS 1x) a una densidad celular de 2×10^6 células/ml. El anticuerpo quimérico 3A4 anti-KAAG1 o una IgG de control se agregaron a 100 μ l de células a una concentración final de 0.5 μ g/ml y se incubaron en hielo durante 1 h. Las células se lavaron en tampón de FCM frío para eliminar los anticuerpos no unidos, se resuspendieron en 100 μ l de tampón de FCM que contenía anti IgG humana conjugada con el anticuerpo secundario FITC (diluido 1: 200) y se incubaron en hielo durante 45 min. Tras otra etapa de lavado en tampón de FCM frío, las células se resuspendieron en 300 μ l de tampón de FCM y se analizaron con un citómetro de flujo. Se agregaron 10 μ g/ml de yoduro de propidio a cada muestra para permitir la selección de células muertas. Los resultados de tres experimentos independientes se muestran en la Figura 11, donde la inducción en veces de la intensidad de fluorescencia media (IFM) representa el valor medio geométrico de la señal obtenida cuando las células se incubaron con el anticuerpo 3A4 sobre el control negativo de IgG humana, que se estableció arbitrariamente en 1. La incubación de los anticuerpos con las células de control 293-6EHEK-293 dio como resultado señales de fluorescencia que fueron similares a la señal obtenida cuando las células se incubaron en ausencia del anticuerpo primario. Además, no hubo diferencia significativa entre la señal obtenida con 3A4 en comparación con la IgG de control. Por otra parte, cuando la IgG de control se incubó con las líneas celulares de cáncer de mama, las señales fueron muy similares a las obtenidas con las células de control 293-6E. Por el contrario, se observó una señal de fluorescencia detectable cuando el anticuerpo 3A4 se incubó con todas las líneas de células de cáncer de mama. Aunque se observó una cantidad variable de fluorescencia, la mayor cantidad de KAAG1 se detectó en la superficie de las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-20, dos líneas celulares de TNBC (véase la Figura 11, las líneas celulares de TNBC se indican con un *asterisco*). De hecho, las cinco líneas celulares de TNBC fueron positivas para la expresión de KAAG1 en estas condiciones. Las células T47 D y MCF-7 también expresaron KAAG1. Tomados en conjunto, este análisis de citometría de flujo muestra que la línea celular de TNBC expresa un alto nivel de KAAG1 en su superficie celular.

Ejemplo 9

Métodos para el uso del anticuerpo 3A4 anti-KAAG1 como un conjugado de anticuerpos

Como se demuestra anteriormente, el antígeno KAAG1 se detectó por 3A4 en la superficie de las células cancerosas usando citometría de flujo. Hay varios eventos moleculares diferentes que pueden ocurrir al unirse un anticuerpo a su diana en la superficie de las células. Estos incluyen i) el bloqueo de la accesibilidad a otro antígeno/receptor o un ligando de la superficie celular, ii) la formación de un complejo de antígeno-anticuerpo relativamente estable para permitir que las células se dirijan a través de ADCC o CDC, iii) los eventos de señalización pueden ocurrir como se ejemplifica por anticuerpos agonistas, iv) el complejo puede internalizarse, o v) el complejo puede desprenderse de la superficie celular. Para abordar esta cuestión, se examinó el comportamiento del complejo anticuerpo 3A4-KAAG1 en la superficie de las células. La línea de células de cáncer de ovario, SKOV3, se usó como control positivo en este experimento ya que se usó con éxito en experimentos de internalización anteriores (véase el documento PCT/CA2009/001586). Se sembraron en placas células MDA-MB-231 de TNBC, se lavaron y se incubaron con 0,5 μ g/ml de anticuerpo 3A4 quimérico como se describe en el Ejemplo 3. Tras el lavado, se añadió medio completo y las células se colocaron a 37 °C durante hasta 60 minutos. Las células se retiraron en los tiempos indicados (véase la Figura 12), se enfriaron rápidamente, se prepararon para citometría de flujo con FICT conjugado con anti IgG humana y los resultados se expresaron como el porcentaje de intensidad de fluorescencia media restante en la superficie celular en comparación con la señal a los 0 minutos (véase la Figura 12, Señal de superficie (% restante a 0 min)). Tal como se ilustra en la Figura 12, la señal de fluorescencia disminuyó rápidamente cuando 3A4 se incubó con células MDA-MB-231 (Figura 12, barras negras, indicadas por MDA-231 en la figura) y pareció alcanzar una pérdida máxima de señal entre 30 - 45 minutos. La pérdida de señal fue comparable a la observada cuando se incubó 3A4 con las células SKOV3 (Figura 12, barras grises). Este resultado indica que el complejo 3A4/KAAG1 desapareció de las células, lo que indica que es probable que se haya producido una internalización del complejo. Los estudios preliminares para dilucidar el mecanismo responsable de esta disminución en la fluorescencia de la superficie celular han revelado que el complejo parece estar internalizado. Se esperan resultados similares con los anticuerpos 3A4 humanizados.

Se observaron resultados similares en dos líneas celulares de TNBC adicionales, denominadas, MDA-MB-436 (Figura 13) y BT-20 (Figura 14), lo que confirma la internalización del complejo 3A4/KAAG1 en la superficie de múltiples líneas celulares de TNBC. Por el contrario, a pesar de niveles similares de IFM de unión de 3A4 sobre la superficie de MDA-

MB-436 y T47D (Figura 11), no se observó la pérdida de señal en la superficie celular cuando se incubó 3A4 con la línea celular T47D. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que la internalización del complejo 3A4/KAAG1 pueda ocurrir en un grado más alto en las células de TNBC (Figura 15) en comparación con las células que no son triple negativas.

5 Estos hallazgos se confirmaron aún más mediante la realización de inmunofluorescencia en células vivas para ver si esta internalización podía observarse microscópicamente. Se sembraron células MDA-MB-231 en cubreobjetos y una vez que las células se adherieron correctamente, se añadió medio nuevo que contenía el anticuerpo 3A4 quimérico anti-KAAG1 a 10 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 4 h. Las células se lavaron en PBS y, a continuación, se fijaron en paraformaldehído al 4% (en PBS) durante 20 min. Después del lavado, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 min. El bloqueo se realizó con leche en polvo al 1,5% en PBS durante 1 h. La proteína de membrana asociada a lisosoma 1 (LAMP1, Chang et al., 2002) se detectó incubando con anti-LAMP1 (Santa Cruz, sc-18821, diluida 1: 100) en leche al 1,5% en PBS durante 2 h. Después de lavar en PBS, los anticuerpos secundarios se agregaron juntos en leche al 1,5% y se incubaron durante 1 h. Para el anticuerpo quimérico anti-KAAG1, el anticuerpo secundario fue un anti IgG humana de burro (H + L) conjugado con Rodamina Rojo-X diluido a 1: 300. Para el anticuerpo anti-LAMP1, el anticuerpo secundario fue un anti IgG de ratón de cabra (H+L) conjugado con DyLight488 diluido 1: 300. Ambos anticuerpos secundarios fueron de Jackson ImmunoResearch. Los cubreobjetos se lavaron en PBS y se montaron en un reactivo antifade ProLong Gold con DAPI. Como se muestra en la figura 7, después de 4 horas de incubación a 37 °C en presencia de células cancerosas MDA-MB-231, el anticuerpo 3A4 pudo detectarse en complejos predominantemente cerca del área perinuclear (*flechas*, véase tinción roja en el panel izquierdo en la Figura 16).), que es típico de las vías de internalización basadas en endosoma-lisosoma. Esta observación se confirmó aún más cuando se visualizó un marcador lisosomal, LAMP1 y se encontró que también se expresaba en estas áreas (*flechas*, véase tinción verde en el panel central en la Figura 16). De manera importante, la mezcla de las dos imágenes dio como resultado la aparición de estructuras de color amarillo-naranja que indican que los anticuerpos 3A4 y anti-LAMP1 estaban presentes en las mismas estructuras (*flechas*, véase la tinción amarilla en el panel derecho en la Figura 16). La colocalización de 3A4, que se une a KAAG1 en la superficie de las células cancerosas, con LAMP1, un marcador de endosomas/lisosomas tardíos, muestra que el complejo anticuerpo/antígeno se internalizó y que sigue una vía susceptible para la liberación de una carga útil que sería conjugada al anticuerpo 3A4. Se observaron resultados idénticos en otra la línea celular de TNBC, BT-20 (véase la Figura 17).

Tomados en conjunto, estos estudios demostraron que los anticuerpos específicos para KAAG1, tal como el 3A4, podrían tener usos como conjugado de anticuerpos, en particular, como conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Por lo tanto, el alto nivel de especificidad de TNBC de KAAG1, junto con la capacidad de esta diana para internalizarse en las células, apoya el desarrollo de aplicaciones como un ADC.

Ejemplo 10

Con el fin de demostrar que los anticuerpos anti-KAAG1 pueden dirigir y matar de manera eficaz las células que carecen de expresión de proteína ER, expresión de proteína PgR y/o que muestran ausencia de sobreexpresión de proteína HER2, se generaron dos conjugados fármaco anticuerpo (ADC); 3A4-ADC1 y 3A4-ADC2.

Para ese efecto, se utilizó el anticuerpo 3A4 quimérico y se conjugó un fármaco citotóxico a través de un enlazador peptídico altamente estable que se escinde selectivamente mediante enzimas lisosómicas después de la internalización (3A4-ADC1), o se conjugó con otro fármaco antimetabólico a través de un enlazador no escindible (3A4-ADC2). El fármaco citotóxico puede activarse una vez que se internaliza en las células.

La capacidad de los ADC de 3A4 para detectar KAAG1 en la superficie de las células de TNBC se determinó mediante citometría de flujo utilizando los métodos descritos en el presente documento. Brevemente, se incubaron 3A4, 3A4-ADC1, 3A4-ADC2 no conjugados y una IgG de control en presencia de células MDA-231 de TNBC, que son positivas para KAAG1. Los resultados indicaron que la conjugación de 3A4 con cualquiera de los fármacos no afectó su unión a células de cáncer de mama triple negativo, tal como MDA-231 (datos no mostrados).

Habiendo confirmado que los ADC de 3A4 podían unirse a KAAG1 expresado sobre la superficie de las células de TNBC, se evaluó su citotoxicidad contra estas células en ensayos de proliferación celular. Las células MDA-231 o TOV-112D se cultivaron como se describe anteriormente en los ejemplos previos. Las células se sembraron a 3000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en 200 µl de medio por pocillo durante la noche a 37 °C, en 5 % de CO₂. Al día siguiente, el medio se reemplazó con medio nuevo que contenía anticuerpos, en concentraciones que oscilaron entre 0,122 nM y 500 nM, y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Todas las condiciones se realizaron en pocillos por triplicado. El número de células supervivientes se determinó realizando un ensayo de proliferación celular, utilizando una solución CellTiter 96 Aqueous One (Promega, Madison, WI), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras la recopilación de los datos sin procesar, los resultados se expresaron como el porcentaje de supervivencia en comparación con el número de células en los pocillos tratados con PBS, que se estableció en el 100%. Los resultados indicaron que el 3A4 no conjugado no afectó la proliferación de células MDA-231 en todas las concentraciones probadas. Por el contrario, Los ADC de 3A4 probados mostraron una citotoxicidad significativa.

Estos resultados indican que los conjugados de anticuerpos 3A4 se pueden usar como un tratamiento alternativo para

pacientes con cáncer de mama triple negativo o cáncer de mama tipo basal. Se esperan resultados similares para conjugados a base de anticuerpos 3A4 humanizados.

Secuencias referidas en la descripción

5 SEQ ID NO:1

GAGGGGCATCAATCACACCGAGAAGTCACAGCCCCTCAACCCTGAGGTGTGGGGGGGTAGGGAT
 CTGCATTTCTTCATATCAACCCACACTATAGGGCACCTAAATGGGTGGGCGGTGGGGGAGACCG
 ACTCACTTGAGTTTCTTGAAGGCTTCCTGGCCTCCAGCCACGTAATTGCCCCCGCTCTGGATCTG
 GTCTAGCTTCCGGATTCCGGTGGCCAGTCCGCGGGGTGTAGATGTTCCCTGACGGCCCCAAAGGGTG
 CCTGAACGCCGCCGGTACCTCCTCAGGAAGACTTCGAAGCTGGACACCTTCTTCTCATGGATG
 ACGACGCGGCGCCCCGCTAGAAAGGGTCCCCGTTGCGGTACACAAGCACGCTCTTCACGACGGG
 CTGAGACAGGTGGCTGGACCTGGCGCTGCTGCCGCTCATCTTCCCCGCTGGCCGCCGCTCAGCT
 CGCTGCTTCGCGTCGGGAGGCACCTCCGCTGTCCCAGCGGCCCTACCGCACCCAGGGCGCGGGAT
 CGCCTCCTGAAACGAACGAGAACTGACGAATCCACAGGTGAAAGAGAAGTAACGGCCGCTGCCGC
 TAGGCGTCCACCCAGAGGAGACACTAGGAGCTTGCAGGACTCGGAGTAGACGCTCAAGTTTTTCA
 CCGTGGCGTGCACAGCCAATCAGGACCCGAGTGCAGCGCACACACCAGGTTACCTGCTACGGG
 CAGAATCAAGGTGGACAGCTTCTGAGCAGGAGCCGAAACGCGCGGGGCCTTCAAACAGGCACGC
 CTAGTGAGGGCAGGAGAGAGGAGGACGCACACACACACACACACAAATATGGTGAAACCCAAT
 TTCTTACATCATATCTGTGCTACCCTTTCCAAACAGCCTA

10 SEQ ID NO:2

MDDDAAPRVEGVPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAHLPRWPPQLAASRREAPPLSQRPHRTQG
 AGSPPETNEKLTNPQVKEK

15 SEQ ID NO:3

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAATAGGACAGAAGGTCCTATGAA
 CTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAACTTTCAAAGAAGTCTTTGGCCTGGTACCAGC
 AGAAACCAGGCCAGTCTCCTAAACTTCTGATATACTTTGCATCCACTCGGGAATCTAGTATCCCT
 GATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGA
 AGACCTGGCAGATTACTTCTGTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGACCA
 AGCTGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
 GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA
 AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
 GTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
 AGAGTGT

SEQ ID NO:4

20 DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCSSQSLNSNFQKNFLAWYQKPGQSPKLLIYFASTRESSIP
 DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELKAVAAPSVFI FPPSDEQL
 KSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:5

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGTCCTG
CAAGGCTTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACACTGGGTGAAGCAGACTCCTGTGCATG
GCCTGGAATGGATTGGGGTTATTGATCCTGAAACTGGTAATACTGCCTTCAATCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAACTCAGCAGTTTGAC
ATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTTATTCTGATTATTGGGGCCAAGGCACCACTC
TCACAGTCTCCTCAGCCTCAACGAAGGGCCATCTGTCTTCCCTGGCCCCCTCCTCCAAGAGC
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAG
GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
TGCAACGTGAATCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA

ATTCACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCT
TCCCCCAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCG
TCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCAG
CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGC
AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAA

5 SEQ ID NO:6

EVQLQQSVAELVLRPGASVTLSCASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNFAFNQKFK
GKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQTTTLTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKS
TSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

10 SEQ ID NO:7

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACGCTCCCTGTCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTC
TTGTAGATCGAGTCAGAGCCTTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTATTTGCAGA
AACCAGGCCAGCCTCCAAAGGTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCGGAGTGGAGGCTGAGGA
TCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAGGTTTCACATGTTCTCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGC
TGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG
ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
GTGT

SEQ ID NO:8

DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIIYKVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGYYCFQGSHPVPLTFGAGTKLELKAAPAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 SEQ ID NO:9

SEQ ID NO:9

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTG
TAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGACAACCTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGA
GCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTCCCGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCGCCTGAC
ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGGA
CTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTCCCTGGCCCCCTCCTCC
AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATC
TTGTGAATTCACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCT
TCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG

GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCC
TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAG
GCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAG
ACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA

5 SEQ ID NO:10

EIQLOQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDNYMNVVKQSHGKSLEWIGDINPYYGTTTYNQKFK
GKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDWDFDYWGQTLVTVSAASTKGPSVFLPLAPSS
KSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:11

GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCAC
TTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCATAACTTTTTAAACTGGTTCAGCAGAAACCAGGAAAATCTC
CAAAGACCCTGATCTTTCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGT
GGATCTGGGCAAGATTATCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTTTGAAGATTTGGGAATTTATTC
TTGFTACAGTATGATGAGATTCGGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGAGCTG
TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCT
GTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
TCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
ACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

15

SEQ ID NO:12

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGVP SRFSGS
GSGQDYSLTISSLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELRVAAPS VIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:13

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTG
CACTGTCAGTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAA
ACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAACTACGATGGTCACAATGACTACAACCCATCTCTCAA
AGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACCAGTTCCTCCTGCAGTTGAATTCTGTGAC
TACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGCTTATTTGCTTACTGGGGCC
AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTCCCTGGCCCC
TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC
TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC
CAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC

AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAA

5 SEQ ID NO:14

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHNDYNPSLK
SRISITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVSFCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

10 SEQ ID NO:15

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAATAGGACAGAAGGTCACTATGAA
CTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAACTTTCAAAGAAGCTTTTGGCCTGGTACCAGC
AGAAACCAGGCCAGTCTCCTAACTTCTGATATACTTTGCATCCACTCGGGAATCTAGTATCCCT
GATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGA
AGACCTGGCAGATTACTTCTGTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGACCA
AGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO:16

15 DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCSSQSLLSNFQKNFLAWYQKPGQSPKLLIYFASTRESSIP
DRFIGSGSGTDFLTLSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:17

20 GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGGGCTTCCAGTGACGCTGTCTCTG
CAAGGCTTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACTGGGTGAAGCAGACTCCTGTGCATG
GCCTGGAATGGATTGGGGTTATTGATCCTGAACTGGTAATACTGCCTTCAATCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCAGCAGTTTGAC
ATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTTATTCTGATTATTGGGGCCAAGGCACCACTC
TCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:18

EVQLQQSVAELVRPGASVTL SCKASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNTAFNQKFK
GKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:19

5 GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACGCTCCCTGTCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTC
TTGTAGATCGAGTCAGAGCCTTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTATTTGCAGA
AACCAGGCCAGCCTCCAAAGGTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCGGAGTGGAGGCTGAGGA
TCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGC
TGGAGCTGAAA

SEQ ID NO:20

10 DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIIYKVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLVYYCFQGSVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:21

15 GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTG
TAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGACAACACTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGA
GCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCCTCCCGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCGGCCTGAC
ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGGA
CTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO:22

20 EIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDNYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPYYGTTTYNQKFK
GKATLTFVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDWDFDYWGQGTTLVTVSA

SEQ ID NO:23

20 GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCAC
TTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCATAACTTTTTAAACTGGTTCAGCAGAAACCAGGAAAATCTC
CAAAGACCCTGATCTTTCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGT
GGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTTTGAAGATTTGGGAATTTATTC
TTGTCTACAGTATGATGAGATTCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGA

SEQ ID NO:24

25 DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQKPGKSPKTLIFRANRLVDGVPSRFSGS
GSGQDYSLTISSLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELR

SEQ ID NO:25

30 GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTG
CACTGTCAGTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTCCAGGAA
ACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAACTACGATGGTCACAATGACTACAACCCATCTCTCAA
AGTCGAATCTCTACTCAAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCACTTGAATTTCTGTGAC
TACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGCTTATTTGCTTACTGGGGCC
AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO:26

35 EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWGMGYINYDGHNDYNPSLK
SRISITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGTTLVTVSA

SEQ ID NO:27

KSSQSLLSNFQKNFLA

SEQ ID NO:28

FASTRES

5

SEQ ID NO:29

QQHYSTPLT

10

SEQ ID NO:30

GYIFTDYEIH

15

SEQ ID NO:31

VIDPETGNTA

SEQ ID NO:32

20

MGYSDY

SEQ ID NO:33

RSSQSLLSHNGNTYLE

25

SEQ ID NO:34

KVSNRFS

30

SEQ ID NO:35

FQGS HVPLT

SEQ ID NO:36

35

GYTFDNYMN

SEQ ID NO:37

40

DINPYYGTTT

SEQ ID NO:38

ARDDWFDY

45

SEQ ID NO:39

KASQDIHNFLN

50

SEQ ID NO:40

RANRLVD

SEQ ID NO:41

55

LQYDEIPLT

SEQ ID NO:42

60

GFSITSGYGWH

SEQ ID NO:43

YINYDGHND

SEQ ID NO:44

5 **ASSYDGLFAY**

SEQ ID NO:45 - secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada de 3A4

**CAGATCCAGTTGGTGCAATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTG
TAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACGACTACATGAGCTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGA
GCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTAACTACAACCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCCTCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGAC
ATCGGAAGACTCAGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACCCGGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAG
GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA**

10

SEQ ID NO:46 secuencia del polipéptido de la región variable de cadena pesada de 3A4

**QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNYNQKFK
GKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSS**

15

SEQ ID NO: 47- secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera de 3A4

**GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGGCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTC
TTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTCTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTTCAGA
AACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCCACACAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCCAGAC
AGATTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA
TCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAGGC
TGGAGCTGAAA**

20

SEQ ID NO:48 secuencia del polipéptido de la región variable de cadena ligera de 3A4

**DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGAGTRLELK**

25

SEQ ID NO:49- secuencia del polipéptido de CDR1 de cadena pesada de 3A4

GYTFTDDYMS

30 SEQ ID NO:50- secuencia del polipéptido de CDR2 de cadena pesada de 3A4

DINPYNGDTNYNQKFKG

35 SEQ ID NO:51- secuencia del polipéptido de CDR3 de cadena pesada de 3A4

DPGAMDY

SEQ ID NO:52- secuencia del polipéptido de CDR1 de cadena ligera de 3A4

40 **RSSQSLLSNGNTYLE**

SEQ ID NO:53- secuencia del polipéptido de CDR2 de cadena Ligera de 3A4

45 **TVSNRFS**

SEQ ID NO:54- secuencia del polipéptido de CDR3 de cadena ligera de 3A4

FQGSHPVPLT

50 SEQ ID NO:55

GTAAGCAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC

SEQ ID NO:56

5 **GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC**

SEQ ID NO:57

**GCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG**

10

SEQ ID NO:58

**AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

15

SEQ ID NO:59

**CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGTGAGTAC
TCCCTCTCAAAGCGGGCATTACTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGAGGAGGATTT
GATATTCACCTGGCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCT
CCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCATGAACTTTCTGCT
GTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTT
GAGACGGAGCTTACAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT**

ACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA
GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG
GGGAGAGTGTAGGGTACCGCGCCGCTTCGAATGAGATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATA
AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTACTCGGAAGGACAT
ATGGGAGGGCAAATCATTGGTTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGCCGGAC
GAACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCCCTCTTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGT
TGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGGGCCCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAA
GGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGC
TTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTTGCCCTTTATGTGTAACCTC
TTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGGGGGCCAGGAAGACTACGG
GAGGCTACACCAACGTCATCAGAGGGGCCGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCCTCAAGAGGGC
ATTAGCAATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTA
GTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTC AATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATGC
TATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTAAGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTCA
CGTTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGT
GGCTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCCTGAATCTTCGCTGCTTCTTCATCTCCTTC
GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAA
GGTTTCAGGTGACGCCCCCAAGATAAAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGA
CACCAATATAACCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTTCTGAA
TATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCTCACAC
GAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGT
CCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGA
GTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACTGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAACGGGGCTC
CACGCCAATGGGGCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTTGAAATTTGTGGAGTGGGG
GCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAAATAACTTG
GCTGATTGTAACCCCGCTAACCCTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCC
CGGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAGG
ACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTGTGGTCCCTCATATTCACGAGGT
CGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAATATCTGGATAGCA
TATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC
TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCC
TAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATC
TGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATAT
CTGGGTAGCATATACTACCCAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC
ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATG
CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATC
CTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCACGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTTCTTG
AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTT
AGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATA
CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG
GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTC
CTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACG
TTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCG
GGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTC
ACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAG
TGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTT
TGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATA
CCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC
TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCAGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
CAGGACCACCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGT

GAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCCTATCGTAGT
 TATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTG
 CCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTA
 AAAC TTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAT
 CCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
 GAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAACAAAACCACCGCTACCAGCGGTG
 GTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCA
 GATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCAC
 CGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGT
 CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGG
 TTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC
 ATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTC
 GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGG
 GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA
 AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC TGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTT
 TTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGC
 TCGCCGACCCGAACGACCCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATAC
 GCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGAC
 TGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGC
 TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAG
 GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTGACCAATTCTCATGTTGACA
 GCTTATCATCGCAGATCCGGGCAACGTTGTTGCATTGCTGCAGGCGCAGAACTGGTAGGTATGGC
 AGATCTATACATTGAATCAATATTTGGCAATTAGCCATATTAGTCAATTGGTTATATAGCATAAATC
 AATATTTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTTGGCTC
 ATGTCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG
 GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT
 GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCC
 AATAGGGACTTTCCATGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC
 ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG
 CATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
 CGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCAC
 GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCATGGGAGTTTGTTTTTGGCACAAAATCAACGG
 GACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG
 GGAGGTCATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCTTCCGCATCGCTG
 TCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTACTCT
 TGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCAT
 CGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACAGTCAAGTCAAGGTAGGCTGAGC
 ACCGTGGCGGGCGGACGGGTGGCGGTCCGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTA
 ATTAAGTAGGCGGT

SEQ DI NO:60

5 **ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCC**

SEQ ID NO:61

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTTTGATGACCCAACTCC

10

SEQ ID NO:62

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATCGTTATGTCTCAGTCTCC

15

SEQ ID NO:63

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGC

SEQ ID NO:64

20

GTAAGCGCTAGCGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTCCCCTGGCCCC

SEQ ID NO:65

5 GTAAGCGAATTCACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG

SEQ ID NO:66

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT

10

SEQ ID NO:67

ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

15

SEQ ID NO:68

CTTGAGCCGGCGGATGGTTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGTGAGTAC
TCCCTCTCAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGAGGAGGATTT
GATATTCACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCT
CCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAAGTTTGC CGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTATG
GGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGCGGAGACGGAGCTTACGGGCCATCTGTCTTT
CCCCTGGCCCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACCTC
TGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGATCCCCGAC
CTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTC
TCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTGGTTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCT
AGAGCCCCGCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCTTCTTCCGCGGGCAGT
GCATGTAATCCCTCAGTTGGTGGTACAACCTGCCAAGTGAACCTAAACGGGTAGCATATGCT
TCCCGGTTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCTAATCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA
AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTAAGGAACAGCGATGTAGGTGGCGGGC
CAAGATAGGGGCGGATTGCTGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGGCGCTGAGCGCCAA
GCACAGGGTTGTTGGTCCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATG
GGTAGCATATACTACCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
GGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTA
TCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTA
ATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGA
GATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCAAATATCTGGAT
AGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT
AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCT
ATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCT

AATCTATATCTGGGTTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCACGA
 TGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTT
 TATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
 CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA
 ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCCG
 CCCTTATTCCTTTTTTGGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAA
 GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
 TAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGC
 TATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTAT
 TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
 AAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA
 CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT
 GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGC
 AGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCAGCAAC
 AATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT
 GGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
 GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG
 ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTCAGAC
 CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT
 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGT
 CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC
 TTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCT
 TTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATCTGTCTTCTAGTGTAGCCGT
 AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA
 CCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCCTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
 GGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGA
 CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
 AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
 GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT
 TGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTC
 CTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTTCCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAA
 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
 CAGTGAGCGAGGAAGCGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGA
 TTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTT
 CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGA
 CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATGACGTCAATGGGTG
 GAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCC
 TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACT
 TTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAG
 TACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATGACGT
 CAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTGTAATAACCCCGCCC
 CGTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTG
 AACCGTCAGATCCTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTT
 GAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGT
 ACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGC
 GTCTAACAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGCAGCGGTTGGCGGTCGG
 GGTTGTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO:69

5

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGT

SEQ ID NO:70

10

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCGAGGTTTCAGGAGTCAGG

SEQ ID NO:71

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAGGC

5 SEQ ID NO: 89: Realización a modo de ejemplo de CDRL1

K-S-S-Q-S-L-L-N/H-S/T-S/N/D-N/G-Q/N/K-K/L-N-Y-L-A

10 SEQ ID NO:90: Realización a modo de ejemplo de CDRL1

K-A-S-Q-D-I-H-N/T-Y/F-L-N

SEQ ID NO:91: Realización a modo de ejemplo de CDRL2

15 **F-A-S-T-R-E-S**

SEQ ID NO: 92: Realización a modo de ejemplo de CDRL2

20 **L-V-S-K-L-D-S**

SEQ ID NO:93: Realización a modo de ejemplo de CDRL2

R-A-N-R-L-V-D

25 SEQ ID NO:94: Realización a modo de ejemplo de CDRL3

Q-Q-H-Y-S-T-P-L-T

30 SEQ ID NO:95: Realización a modo de ejemplo de CDRL3

W/L-Q-Y/G-D/T-A/E/H-F-P-R-T

SEQ ID NO:96: Realización a modo de ejemplo de CDRH1 1

35 **G-Y-T/I-F-T-D/E-Y-E/N-M/I/V-H**

SEQ ID NO:97: Realización a modo de ejemplo de CDRH1

40 **G-F-T/S-I-T-S-G-Y-G-W-H**

SEQ ID NO:98: Realización a modo de ejemplo de CDRH2

V/N/G-I/L-D-P-E/A/G-T/Y-G-X-T-A

45 SEQ ID NO:99: Realización a modo de ejemplo de CDRH2

Y-I-N/S-F/Y-N/D-G

50 SEQ ID NO:100: Realización a modo de ejemplo de CDRH3

M-G-Y-S/A-D-Y

SEQ ID NO:101: Realización a modo de ejemplo de CDRH3

55 **A-S-S-Y-D-G-F-L-A-Y**

SEQ ID NO:102: Realización a modo de ejemplo de CDRH3 3

A-R/W-W/F-G-L-R-Q/N

60 SEQ ID NO:103 - región variable de la cadena ligera de 3A2

**DAVMTQIPLTSLSVTIGQPASLSCKSSQSLLSHDGKTYLNWLLQRPQSPKRLISLVSKLDSGVPD
RFTGSGSGTDFTLKISRVEADLGLYYCWOQTHFPRTFAGGTNLEIK**

ES 2 731 665 T3

SEQ ID NO:104 - región variable de la cadena ligera de 3F6

**SIVMTQTPLTSLVSTIGQPASITCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLISLVSKLDSGVPD
GFTGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIK**

5

SEQ ID NO:105 - región variable de la cadena ligera de 3E8

**DAVMTQIPLTSLVSTIGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPD
RFTGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIK**

10

SEQ ID NO:106 - región variable de la cadena ligera de 3E10

**DIVMTQAAPSVPTPGESVVISCRSSKSLHNSGNTYLYWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLASGVPD
RFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK**

15

SEQ ID NO:107 - región variable de la cadena ligera de 3A9

**DIVMTQSPSSLAMSLGQKVTMSCKSSQSLNNSNQLNYLAWYQKPGQSPKLLVYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHFNTPLTFGAGTKLELK**

20

SEQ ID NO:108 - región variable de la cadena ligera de 3B1

**DIVMTQSPSSLAISVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLVFFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK**

25

SEQ ID NO:109 - región variable de la cadena ligera de 3G5

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLVFFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGSGTKLELK**

30

SEQ ID NO:110 - región variable de la cadena ligera de 3B2

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLVYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK**

35

SEQ ID NO:111- región variable de la cadena ligera de 3B8

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLVYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

40

SEQ ID NO:112- región variable de la cadena ligera de 3G8

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLVYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

45

SEQ ID NO:113 - región variable de la cadena ligera de 3F7

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLIYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

50

SEQ ID NO:114 - región variable de la cadena ligera de 3E9

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLVYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTEFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

55

SEQ ID NO:115 - región variable de la cadena ligera de 3C3

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQNLYLAWYQKPGQSPKLLVYFGSTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISGVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

SEQ ID NO:116 - región variable de la cadena ligera de 3E12

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCSSQSLLNRSNQNKNYLAWYQOKPGQSPKLLVYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK**

5 SEQ ID NO:117 - región variable de la cadena ligera de 4A2

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCSSQSLLNNSNQNKNYLAWYQOKPGQSPKLLLYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTYFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLDLK**

10 SEQ ID NO:118 - región variable de la cadena ligera de 3F10

**DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSCKSSQSLLNTSNQLNKNYLAWYQOKPGQSPKLLVYFASTTESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

15 SEQ ID NO:119 - región variable de la cadena ligera de 3F4

**DIVMTQSPSSLTMTAGEKVTMSCKSSQSLLNTSNQNKNYLAWYQOKPGQSPKLLVYFASTRASGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

20 SEQ ID NO:120 - región variable de la cadena ligera de 3B11

**DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNNSNQNKNYLAWYQOKPGQSPKLLVYFASTRESGVP
DRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK**

25 SEQ ID NO:121- región variable de la cadena ligera de 3G12

**DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVGTAVAWYQOKPGQSPELLIYWTSTRHTGVPDRFSGS
GSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELR**

30 SEQ ID NO:122 - región variable de la cadena ligera de 3D1

**DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHTYLNWFQOKPGKSPETLIYRANRLVDGVPSRFGS
GSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDAFPLTFGAGTKLELK**

35 SEQ ID NO:123- región variable de la cadena ligera de 3C2

**DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNYLNWFQOKPGKSPKTLIHRANRLVAGVPSRFGS
GSGQDYSLTISSLEYEDLGIIYYCLQYDAFPLTFGAGTKLELK**

40 SEQ ID NO:124- región variable de la cadena ligera de 3E6

**DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNYLNWFQOKPGKSPKTLIHRANRLVAGVPSRFGS
GSGQDYSLTISSLEYEDLGIIYYCLQYDAFPLTFGAGTKLELK**

45 SEQ ID NO:125 - región variable de la cadena ligera de 3H3

**DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHRFLNWFQOKPGKSPKTLIFHANRLVDGVPSRFGS
GSGLDYSLTISSLEYEDMGIYFCLOQYDAFPLTFGAGTKLELK**

SEQ ID NO:126 - región variable de la cadena pesada de 3A2

**HEIQLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTF TDYNMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTEYNEKF
KGRATLTS DKSSSTAYMDLSSLTSDDSAVYFCANWGLRQWGQGT LVTVST**

SEQ ID NO:127 - región variable de la cadena pesada de 3F6

**HEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTEYNIHWVKQKPGQGP EWIGNINPYNDVTEYNEKF
K GKATLTS DKASSTAYMDLSSLTSEDSAVYYCARWGLRNLWGQGT LVTVSA**

SEQ ID NO:128 - región variable de la cadena pesada de 3E8

HEVQLQQSVPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTEYNMHWVKQKPGQGPWIGNINPYNVTEYNEKF
K GKATLTS DKSSSTAYLDLSSLTSEDSAVYYCARWGLRNWGQGTTLTVSA

SEQ ID NO:129 - región variable de la cadena pesada de 3A9

5

HQVQVQQPGAELVRPGASVTLSCASGYIFTDYEVHWVRQRPVHGLEWIGVIDPETGDTAYNQKF
K GKATLTADKSSSTAYMELSSLTAEDSAVYYCIGYADYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:130 - región variable de la cadena pesada de 3B1

10

HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGDTAYNQKF
K GKATLTTDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:131 - región variable de la cadena pesada de 3B2

15

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGATAYNQKF
K GKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:132 - región variable de la cadena pesada de 3F4

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGSTAYNQKF
K GKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

20

SEQ ID NO:133 - región variable de la cadena pesada de 3E9

HEVQLQQSGAELVRPGASATLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGSTAYNQKF
K GKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYADYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:134 - región variable de la cadena pesada de 3B8

25

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGDTAYNQNF
T GKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYADYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:135 - región variable de la cadena pesada de 3G8

30

HQVQLKQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEVHWVKQTPVHGLEWIGVIDPATGDTAYNQKF
K GKATLTADKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:136 - región variable de la cadena pesada de 3F7

35

HQAYLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGDTAYNQKF
K DKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:137 - región variable de la cadena pesada de 3E12

HQVQLQQSEAELVKPGASVKLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGDTAYNQKF
K GKATLTADKSSSTAYMELSRSLTSEDSAVYYCMGHSDYWGQGTTLTVSS

40

SEQ ID NO:138 - región variable de la cadena pesada de 3G12

HEVQLQQSVAELVRPGASVTVSCKASGYIFTDYEIHWVKQTPAHGLEWIGVIDPETGNTAFNQKF
K GKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:139 - región variable de la cadena pesada de 3F10

45

HEVQLQQSVAELVRPGAPVTLSCASGYTFTDYEVHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGATAYNQKF
K GKATLTADKSSSAAYMELSRSLTSEDSAVYYCMSYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:140 - región variable de la cadena pesada de 3C3

**HEVQLQQSVAEVVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGVTAYNQRF
RDKATLTTDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCMGYSDYWGQGTTLTVSS**

SEQ ID NO:141 - región variable de la cadena pesada de 3G5

5 **HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVLDPGTGR TAYNQRF
KDKATLSADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMSYSDYWGPGTTLTVSS**

SEQ ID NO:142 - región variable de la cadena pesada de 3B11

10 **HEVQLQQSVAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVRGLEWIGVIDPATGDTAYNQRF
K GKATLTADKSSSAAFMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS**

SEQ ID NO:143 - región variable de la cadena pesada de 3E6

**HQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTSDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGDTVYNQKF
K GKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCISYAMDYWGQGTSVTVSS**

15 SEQ ID NO:144 - región variable de la cadena pesada de 4A2

**HQVKLQQSGTELVRPGASVTLSCKASGYKFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGGTAYNQKF
K GKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCISYAMDYWGQGTSVTVSS**

SEQ ID NO:145 - región variable de la cadena pesada de 3E10

20 **HEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGDTFTDYIMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNYGGITYNQKF
K GKATLTVDTSSSTAYMELRGLTSEDSAVYYCQAYRNSDYWGQGTTLTVSS**

SEQ ID NO:146 - región variable de la cadena pesada de 3D1

25 **HEVQLQESGPD LVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGHWIRQFP GDKLEWMGYISFNGDYNPNPSL
KSRISITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGLVTVSA**

SEQ ID NO:147 - región variable de la cadena pesada de 3C2

**HDVQLQESGPD LVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGHWIRQFP GNKLEWMGYISFNGDSNPNPSL
KSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGPLVTVSA**

A

30 SEQ ID NO:148

KSSQSLHSDGKTYLN

35 SEQ ID NO:149

LVSKLDS

SEQ ID NO:150

40 **WQGTHFPRT**

SEQ ID NO:151

45 **GYTFTD YNMH**

SEQ ID NO:152

YINPYNDVTE

50 SEQ ID NO:153

AWFGL RQ

SEQ ID NO:154

5

RSSKSLLSNGN TYLY

SEQ ID NO:155

10

RMSNLAS

SEQ ID NO:156

MQHLEYPYT

15

SEQ ID NO:157

GDTFTD YMN

20

SEQ ID NO:158

DINPNYGGIT

SEQ ID NO:159

25

QAYYRNS DY

SEQ ID NO:160

30

KASQDVGTA

SEQ ID NO:161

WTSTRHT

35

SEQ ID NO:162

QQHYSIPLT

40

SEQ ID NO:163

GYIFTDYEIH

SEQ ID NO:164

45

VIDPETGNTA

SEQ ID NO:165

MGYSDY

50

SEQ ID NO:166

**MVLQTVFISLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSNFQKNFLAWYQQK
PGQPPKLLIYFASTRESSVPDRFSGSGSDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSTPLTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

55

SEQ ID NO:167

MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYEIHWVRQAPGQGLE
WMGVIDPETGNTAFNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCMGYSDYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

SEQ ID NO: 168

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNFQKNFLAWYQOKPGQPPKLLIYFASTRESSVP
DRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQHSTPLTFGQGTKLEIK

SEQ DI NO:169

10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVIDPETGNTAFNQKFK
GRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCMGYSDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:170

15 MVLQQTQVFI SLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIHNFLNWFQOKPGKAPK
TLIFRANRLVDGVPSPRFSGSGSDYTLTITSSLPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:171

20 MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSITSGYGWHWIRQHPGKGL
EWIGYINYDGHNDYNPSLRSRVTISQDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASSYDGLFAYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQ
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 172

20 DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIHNFLNWFQOKPGKAPKTLIFRANRLVDGVPSPRFSGS
GSGTDYTLTITSSLPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:173

25 EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSITSGYGWHWIRQHPGKGLEWIGYINYDGHNDYNPSL
KSRVTISQDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASSYDGLFAYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:186 (región variable consenso 1 de cadena ligera de variantes de 3A4)

30 DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHVPLTFGXGXLEK

en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 48. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

35 SEQ ID NO:187 (región variable consenso 2 de cadena ligera de variantes de 3A4)

**DX_{a1}VMTQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{a7}LLIHTVε
NRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{a8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K**

En donde X_{a1} puede ser un aminoácido hidrófobo;

- 5 En donde X_{a2} puede ser A o P;
En donde X_{a3} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;
En donde X_{a4} puede ser L o P;
en donde X_{a5} puede ser un aminoácido ácido;
En donde X_{a6} puede ser Q o P;
10 En donde X_{a7} puede ser un aminoácido básico;
En donde X_{a8} puede ser un aminoácido hidrófobo;
En donde X_{a9} puede ser A o Q;
En donde X_{a10} puede ser un aminoácido básico; o En donde X_{a11} puede ser un aminoácido hidrófobo,
en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa
15 o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la
SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO:188 (región variable consenso 3 de cadena ligera de variantes de 3A4)

**DX_{A1}VMTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{A7}LLIHTV
20 SNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{A8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{A9}GTX_{A10}LEX_{A11}K**

- En donde X_{A1} puede ser V o I
En donde X_{A2} puede ser A o P
25 En donde X_{A3} puede ser S o T
En donde X_{A4} puede ser L o P
En donde X_{A5} puede ser D o E
En donde X_{A6} puede ser Q o P
En donde X_{A7} puede ser K o Q
En donde X_{A8} puede ser L o V
30 En donde X_{A9} puede ser A o Q
En donde X_{A10} puede ser R o K o
En donde X_{A11} puede ser L o I,
en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa
35 o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la
SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO:189 (región variable de cadena ligera de variante 1 de 3A4: Lvh1)

**DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPP
40 RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK**

SEQ ID NO:190 (región variable de cadena ligera de variante 2 de 3A4: Lvh2)

**DVVMQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPP
45 RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK**

SEQ ID NO:191 (región variable consenso 1 de cadena pesada de variantes de 3A4)

**QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNGDTNYNQ
50 KFKGXXXTXDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXTVTVSS**

en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o
no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID
NO: 46. La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservativa.

SEQ ID NO:192 (región variable consenso 2 de cadena pesada de variantes de 3A4)

QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}LEWX_{b11}G
 DINPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDX_{b22}AVYY
 CARDPGAMDYWGQGTGX_{b23}VTVSS

- 5 En donde X_{b1} puede ser un aminoácido hidrófobo;
- En donde X_{b2} puede ser P o A;
- En donde X_{b3} puede ser un aminoácido hidrófobo;
- En donde X_{b4} puede ser V o K;
- En donde X_{b5} puede ser un aminoácido hidrófobo;
- En donde X_{b6} puede ser un aminoácido básico;
- 10 En donde X_{b7} puede ser S o A;
- En donde X_{b8} puede ser H o P;
- En donde X_{b9} puede ser un aminoácido básico;
- En donde X_{b10} puede ser S o G;
- En donde X_{b11} puede ser un aminoácido hidrófobo;
- 15 En donde X_{b12} puede ser un aminoácido básico;
- En donde X_{b13} puede ser un aminoácido hidrófobo;
- En donde X_{b14} puede ser I o T;
- En donde X_{b15} puede ser un aminoácido hidrófobo;
- En donde X_{b16} puede ser un aminoácido hidrófobo;
- 20 En donde X_{b17} puede ser K o T;
- En donde X_{b18} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;
- En donde X_{b19} puede ser Q o E;
- En donde X_{b20} puede ser N o S;
- En donde X_{b21} puede ser T o R;
- 25 En donde X_{b22} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro; o
- En donde X_{b23} puede ser S o L,
- en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 46.

30 SEQ ID NO:193 (región variable consenso 3 de cadena pesada de variantes de 3A4)

QX_{B1}QLVQSGX_{B2}EX_{B3}X_{B4}KPGASVKX_{B5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{B6}QX_{B7}X_{B8}GX_{B9}X_{B10}LEWX_{B11}
 GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{B12}X_{B13}X_{B14}X_{B15}TX_{B16}DX_{B17}SX_{B18}STAYMX_{B19}LX_{B20}SLX_{B21}SEDX_{B22}AV
 YYCARDPGAMDYWGQGTGX_{B23}VTVSS

- 35 En donde X_{B1} puede ser I o V;
- En donde X_{B2} puede ser P o A;
- En donde X_{B3} puede ser M o V;
- En donde X_{B4} puede ser V o K;
- En donde X_{B5} puede ser M o V;
- 40 En donde X_{B6} puede ser K o R;
- En donde X_{B7} puede ser S o A;
- En donde X_{B8} puede ser H o P;
- En donde X_{B9} puede ser K o Q;
- En donde X_{B10} puede ser S o G;
- En donde X_{B11} puede ser I o M;
- 45 En donde X_{B12} puede ser K o R;
- En donde X_{B13} puede ser A o V;
- En donde X_{B14} puede ser I o T;
- En donde X_{B15} puede ser L o I;
- En donde X_{B16} puede ser V o A;
- 50 En donde X_{B17} puede ser K o T;
- En donde X_{B18} puede ser S o T;
- En donde X_{B19} puede ser Q o E;
- En donde X_{B20} puede ser N o S;
- En donde X_{B21} puede ser T o R;
- 55 En donde X_{B22} puede ser S o T; o
- En donde X_{B23} puede ser S o L,
- en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ

ES 2 731 665 T3

ID NO: 46.

SEQ ID NO: 194(región variable de la cadena pesada de la variante 1 de 3A4: Hvh1)

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYN
QKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 195(región variable de la cadena pesada de la variante 2 de 3A4: Hvh2)

10 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYNQ
KFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 196(región variable de la cadena pesada de la variante 3 de 3A4: Hvh3)

15 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQK
FKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 197(región variable de la cadena pesada de la variante 4 de 3A4: Hvh4)

20 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQK
FKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 198 cadena ligera (kappa) murina de 3A4

20 DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 199 variante 1 de la cadena ligera (kappa) humanizada de 3A4; Lh1

25 DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 200 variante 2 de la cadena ligera (kappa) humanizada de 3A4; Lh2

30 DVVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 201 cadena Pesada (Igg1) murina de 3A4

ES 2 731 665 T3

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNYNQ
KFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

SEQ ID NO: 202 variante 1 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYN
QKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

5

SEQ ID NO: 203 variante 2 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh2

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYNQ
KFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO: 204 variante 3 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh3

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQK
FKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

SEQ ID NO: 205 variante 4 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh4

ES 2 731 665 T3

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQK
FKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 206

5 ATACCCAAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACAC

SEQ ID NO: 207

10 ATACCCAAGCTTCATTTCCCGGGAGACAGGGAG

SEQ ID NO: 208

ATACCCAAGCTTGGGCCACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGG

15 SEQ ID NO: 209

ATACCCAAGCTTCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG

20 SEQ ID NO:210 pK-CR5

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTT
 TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGG
 TTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAA
 AGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGT
 TTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTA
 GAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
 GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCC
 GCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGG
 AAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTG
 CAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGGC
 CAGTGAGCGCGGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGG
 CCGCTCTAGA ACTAGTGGATCCACATCGGCGCGCAAATGATTTGCCCTCCCATATGTCCTT
 CCGAGTGAGAGACACAAAAATTCCAACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTTTATTAG
 CCAGAGGTCGAGATTTAAATAAGCTTGCTAGCAGATCTTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGT
 GGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGGTG
 AATATCAAATCCTCCTCGTTTTTTGGAAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCGTTTT
 GAGAGGGAGTACTCACCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATC
 CGCCGTCTCAAGACCGCCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCC
 CGACCGCACCCGCTGCCGCCGCCACGGTGCTCAGCCTACCTTGCGACTGTGACTGGTT
 AGACGCCTTTCTCGAGAGGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGT
 GCGGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGGTTTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGA
 AGAGTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACAGCGATGCGGAAGAG
 AGTGACCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATG
 GCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCCTCCCACCGTA
 CACGCCTACCTCGACCCGGTACCAATCTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTTA
 TAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTTA
 TAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTTA
 TAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTTAAGGTTGTGAGTGAAGACGAAAGGGTTCATT
 AAGGCGCGCCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAG
 GGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG
 CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATG
 AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGT
 CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGGTTTGGGTATTGGGC
 GCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGCTCGGCTGCGGCGAGCGGT
 ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAG
 AACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGT
 TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
 GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC

TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
GGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGC
TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACG
GCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTG
CAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGG
GGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA
AGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT
CTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGAT
TTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTAT
CCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAAT
AGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTAT
GGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCA
AAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTT
TCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCCGAGTTG
CTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCA
TCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT
TCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCT
GGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT
GTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAT
GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
CCGAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:211 pMPG-CR5

GTCGACGATACCGTGCACTTAATTAAGCGCGCTCGACCAAATGATTTGCCCTCCCATATGTC
CTTCCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTTTTATT
AGCCAGAGGTCGAGGTCGGGGGATCCGTTTAACTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGG
AGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGGTGAA
TATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCGCTTTTGA
GAGGGAGTACTCACCCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATCCG
CCGTCTCAAGACCGCCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCCCG
ACCGCCACCCGCTGCCGCCCGCCACGGTGCTCAGCCTACCTTGCGACTGTGACTGGTTAGA
CGCCTTTCTCGAGAGGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGC

5

GGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGGTTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAGACCGCGAAGA
GTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGT
GACCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATGGC
GTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCCTCCCACCGTACA
CGCCTACCTCGACCCGGGTACCAATCTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATA
ATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATA
ATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATA
ATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTAAAGTTGTCGAGTGAAGACGAAAGGGTTAATTAA
GGCGCGCCGTCGACTAGCTTGGCACGCCAGAAATCCGCGCGGTGGTTTTTGGGGGTCCGG
GGTGTGGCAGCCACAGACGCCCGGTGTTCTGTGTCGCGCCAGTACATGCGGTCCATGCC
CAGGCCATCCAAAACCATGGGTCTGTCTGCTCAGTCCAGTCTGGACCAGACCCACGCA
ACGCCCAAATAATAACCCCCACGAACCATAAACCATCCCCATGGGGGACCCCGTCCCTAA
CCCACGGGGCCAGTGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGG
GCCTTACCCGAACCTTGGGGGTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCC
CCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCTTT
ATGAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGG
GTTCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCATCTCCCCTATTCTTT
GCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTCGGTTTCCACTATCGGCGAGTACTTCTACACAGCCAT
CGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACGCCCGACAGTCCCGGCTCCGG
ATCGGACGATTGCGTCGCATCGACCCTGCGCCCAAGCTGCATCATCGAAATTGCCGTCAAC
CAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATACGCCCGGAGCCGCGGCGAT
CCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCGCGTCTGCTGCTCCATAAAGCCAACC
ACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAATCCCCGAACATCGCCTCGCT
CCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCATTGTCCGTCAGGACATTGTTGGAGCCGAAATCC
GCGTGACGAGGTGCCGGACTTCGGGGCAGTCCTCGGCCCAAAGCATCAGCTCATCGAGA
GCCTGCGCGACGGACGCACTGACGGTGTGTCGTCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATGGG
GATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATGTAGTGTATTGACCGATTCTTGGCGTCCG
AATGGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGAGCGATCGCATCCATGGCCTCC
GCGACCGGCTGCAGAACAGCGGGCAGTTCGGTTTCAGGCAGGTCTTGCAACGTGACACCC
TGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTCAGGCTCTCGCTGAATCCCCAATGTCAAGCACTT
CCGGAATCGGGAGCGCGGCCGATGCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACC
ATCGGCGCAGCTATTTACCCGACAGGACATATCCACGCCCTCTACATCGAAGCTGAAAGCA
CGAGATTCTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAGGTCGGAGACGCTGTGCAACTTTTCGATCA
GAAACTTCTCGACAGACGTGCGGGTGTGAGTTCAGGCTTTTTCATATCTCATTGCCCGGGATCT
GCGGCACGCTGTTGACGCTGTTAAGCGGGTTCGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTTCGAGGCCA
CACGCGTCACCTTAATATGCGAAGTGGACCTGGGACCGCGCCCGCCCGACTGCATCTGCGT
GTTTCAATTCCGCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGTCATCATAGAACTAAAGACAT
GCAAATATATTTCTTCCGGGGACACCGCCAGCAAACGCGAGCAAACGGGCCACGGGGATGAA

GCAGGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCT
 GGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCA
 GGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGC
 GGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCT
 CGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCT
 CCCC GCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCG
 GCACCTCGCTAACGGATTCACCACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGCAGGAACTG
 TGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCG
 CACGCGGCGCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATA
 GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
 GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT
 CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
 TCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
 TGCACGAACCCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
 CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
 GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTA
 GAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGT
 AGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCA
 GATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG
 CTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
 CCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTG
 GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT
 ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTG
 GCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT
 AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
 CAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGAA
 CGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCA
 GCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
 AGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGT
 TATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG
 TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGG
 CGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAA
 CGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACC
 CACTCGTGCACCCAACCTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
 AACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC
 AACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACA
 TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC
 CACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGA

GGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCTCTAGCAGATCCGGAATTCCC
CTCCCAATTTAAATGAGGACCTAACCTGTGGAATCTACTGATGTGGGAGGCTGTAAGTGT
ACAAACAGAGGTTATTGGAATAACTAGCATGCTTAACCTTCATGCAGGGTCACAAAAAGTGC
ATGACGATGGTGGAGGAAAACCTATTCAAGGCAGTAATTTCCACTTCTTTGCTGTTGGTGG
GACCCCTTGGAAATGCAGGGAGTGCTAATGAATTACAGGACAAAGTACCCAGATGGTACTAT
AACCCCTAAAAACCAACAGCCCAGTCCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTTGG
ACAAAAACAATGCTTATCCAGTTGAGTGCTGGGTTCCCTGATCCTAGTAGAAATGAAAATACTA
GGTATTTTGGGACTTTCACAGGAGGGGAAAATGTTCCCCAGTACTTCATGTGACCAACACA
GCTACCACAGTGTTGCTAGATGAACAGGGTGTGGGGCCTCTTTGTAAAGCTGATAGCCTGTA
TGTTTCAGCTGCTGATATTTGTGGCCTGTTTACTAACAGCTCTGGAACACAACAGTGGAGAG
GCCTTGCAAGATATTTTAAGATCCGCCTGAGAAAAAGATCTGTAAAGAATCCTTACCTAATTT
CCTTTTGTCTAAGTGACCTTATAAACAGGAGAACCCAGAGAGTGGATGGGCAGCCTATGTAT
GGTATGGAATCCCAGGTAGAAGAGGTTAGGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ACCCAGATATGATAAGATATATTGACAAACAGGGACAATTGCAAACCAAATGCTTTAAACAG
GTGCTTTTATTGTACATATAACATTTAATAAATGCTGCTTTTGTATAAGCCACTTTTAAAGCTTGT
GTTATTTTGGGGTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CTTGACTATGGGGTCTGACCTTTGGGAATGTTTCAGCAGGGGCTGAAGTATCTGAGACTTG
GGAAGAGCATTGTGATTGGGATTCAGTGCTTGATCCATGTCCAGAGTCTTCAGTTTCTGAAT
CCTCTTCTCTTGTAAATATCAAGAATACATTTCCCATGCATATATTATTTTCATCCTTGAAAA
GTATACATACTTATCTCAGAATCCAGCCTTTCCTTCCATTCAACAATTCTAGAAGTTAAAAGT
GGGTAGATGCTATTACAGAGGTAGAATGCTTCTAAACCCAGAAATGGGGGATCTGC

SEQ ID NO:212- secuencia del polipéptido de CDR2 de cadena pesada humanizada de 3A4

5 DINPYNGDTN

SEQ ID NO:213 - OGS18500

10 ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGTGATGACCCAAACTCC

SEQ ID NO:214 - OGS2084

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTCCG

15 SEQ ID NO:215 - OGS1879

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCCAGATCCAGTTGGTGCAATCTGG

20 SEQ ID NO:216 - OGS1810

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAGGC

REFERENCIAS

25 Santana-Davila R. y Pérez E.A. (2010) "Treatment options for patients with triple-negative breast cancer" J Hematol Oncol. 27:42.

de Ruijter T.C., Veeck J., et al. (2011) "Characteristics of triple-negative breast cancer". J Cancer Res Clin Oncol. 137:183.

Ismail-Khan R. y Bui M.M. (2010) "A review of Triple-negative breast cancer" *Cancer Control* 17:173.

Carey L.A., Perou C.M. et al. (2006) "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study". *JAMA* 295:2492.

5 Krieg M., Seynaeve C. et al. (2009) "Sensitivity to first-line chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers." *J Clin Oncol* 27:3764.

10 Rouzier R., Perou C.M. et al. (2005) "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy" *Clin Cancer Res* 11:5678.

Fong P.C., Boss D.S. et al. (2009) "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers." *N Engl J Med* 361:123.

15 Dent R., Trudeau M et al. (2007) "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Feature and Patterns of Recurrence" *Clin. Cancer Res.* 13: 4429.

Bernstein L y J.V. Lacey Jr. (2011) "Receptors, Associations, and Risk Factor Differences by Breast Cancer Subtypes: Positive or Negative?" *J Natl Cancer Inst* 103(6): 451-453 (Advanced publication February 23, 2011).

20 Nofech-Mozes S. et al., (2009) "Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers" *Cancer Res. Treat.* 118: 131-137.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que son capaces de unirse específicamente al antígeno 1 asociado al Riñón (KAAG1) y se conjugan con un resto terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una CDRH1 como se establece en la SEQ ID NO: 49, una CDRH2 como se establece en la SEQ ID NO:50 o en la SEQ ID NO:212, una CDRH3 como se establece en la SEQ ID NO:51, una CDRL1 como se establece en la SEQ ID NO: 52, una CDRL2 como se establece en la SEQ ID NO:53 y una CDRL3 como se establece en la SEQ ID NO: 54.
2. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a la superficie de las células cancerosas.
3. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se unen a un epítipo comprendido entre los aminoácidos 30 a 84 de KAAG1.
4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo son un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se usan en combinación con un agente quimioterapéutico o un agente citotóxico.
6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 48 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 46.
7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 186 en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 48 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 191, en donde al menos uno de los aminoácidos identificados por X es una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 46.
8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7, en donde la región variable de cadena ligera es como se establece en la SEQ ID NO: 187 y en donde la región variable de cadena pesada es como se establece en la SEQ ID NO: 192.
9. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8, en donde la región variable de cadena ligera es como se establece en la SEQ ID NO: 188 y en donde la región variable de cadena pesada es como se establece en la SEQ ID NO: 193.
10. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 9, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden:
- a. una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 189 o SEQ ID NO: 190 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 o SEQ ID NO:197;
 - b. una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 189 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 194;
 - c. una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 189 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 195;
 - d. una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 189 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 196;
 - e. una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 189 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 197;
 - f. una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 190 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 194;
 - g. una región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 190 y una región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 195; o
 - h. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 199 o SEQ ID NO: 200 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:204 o SEQ ID NO:205.

11. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u 8 a 10, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden;
- 5 a. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 199 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 202;
 - b. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 199 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 203;
 - c. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 199 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 204;
 - 10 d. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 199 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 205;
 - e. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 200 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 202;
 - 15 f. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 200 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 203;
 - g. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 200 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 204; o
 - h. una cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 200 y una cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 205.
- 20 12. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el resto terapéutico es un agente citotóxico.
- 25 13. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el resto terapéutico es un compuesto antimetabólico.
- 30 14. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u 8 a 10, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una afinidad de 1 nM o menos o 0,1 nM o menos para KAAG1.
- 35 15. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 8 a 10, 12 a 14, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo está internalizado dentro de una célula.
16. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dichos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se usan con un agente anticanceroso.

Figura 1a

3A4-VL

murino	DVVMTQTPLSLAVSLGQDQASISCRSSQSLLSKSNQNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPLTFGACTRLELK	11/80 (86,3%)
Humanizado 1	DIVMTQTPLSLPVTPCPEPASISCRSSQSLLSKSNQNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYICFQGSHPVPLTFGQCTKLEIK	0/80 (100%)
Humanizado 2	DVVMTQTPLSLPVTPCPEPASISCRSSQSLLSKSNQNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYICFQGSHPVPLTFGQCTKLEIK	2/80 (97,5%)

CDR-L1

CDR-L2

CDR-L3

Figura 1b

3A4-VH

De ratón	QIQLVQSGPEVWVWPKGASVWNSCKASGYTFDDYMSWVWQSHGKSLIEWIGDINPYNGDTNINQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNLSLSEDSAVYYCARDP GAMDYWGQGT SVTVSS	21/82 (74,4%)
Humanizado 1	QVQLVQSGAEVVKKPGASVVKVCKASGYTFDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDIINPYNGDTNINQKFKGRVTITADTSTAYNELSSLRSEDTAVYYCARDP GAMDYWGQGT LVTVSS	0/82 (100%)
Humanizado 2	QIQLVQSGAEVVKKPGASVVKVCKASGYTFDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDIINPYNGDTNINQKFKGRVTITADKSTAYNELSSLRSEDTAVYYCARDP GAMDYWGQGT LVTVSS	2/82 (97,5%)
Humanizado 3	QIQLVQSGAEVVKKPGASVVKVCKASGYTFDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNINQKFKGRATITVDKSTAYNELSSLRSEDTAVYYCARDP GAMDYWGQGT LVTVSS	6/82 (92,7%)
Humanizado 4	QIQLVQSGAEVVKKPGASVVKVCKASGYTFDDYMSWVQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNINQKFKGKATITVDKSTAYNELSSLRSEDTAVYYCARDP GAMDYWGQGT LVTVSS	8/82 (90,2%)

CDR-H1

CDR-H2

CDR-H3

Figura 2a

Alineación de cadena ligera variable

```

VL de ratón          DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRF 60
SEQ ID NO. 189      DIVMTQTPLSLPTPGEPAISICRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRF 60
                    *:*****.*:*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****
                    *:*****.*:*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****

VL de ratón          SGVPDFRFSGSGGTDFTLKI SRVEAEDLVYYCFQGS HVPLTFGAGTRLELK 112
SEQ ID NO. 189      SGVPDFRFSGSGGTDFTLKI SRVEAEDLVYYCFQGS HVPLTFGQGTKLEIK 112
                    *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
                    *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figura 2b

Alineación de cadena pesada variable

```

VH de ratón          QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNY 60
SEQ ID NO. 194      QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY 60
                    *:*****.*:*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****
                    *:*****.*:*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****

VH de ratón          NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNLSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQTSVTVSS 116
SEQ ID NO. 194      NQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQTLVTVSS 116
                    *****:.*:*.*.*:*****:*.** ***:*****:*****:*****:*****
                    *****:.*:*.*.*:*****:*.** ***:*****:*****:*****

```

Figura 3a

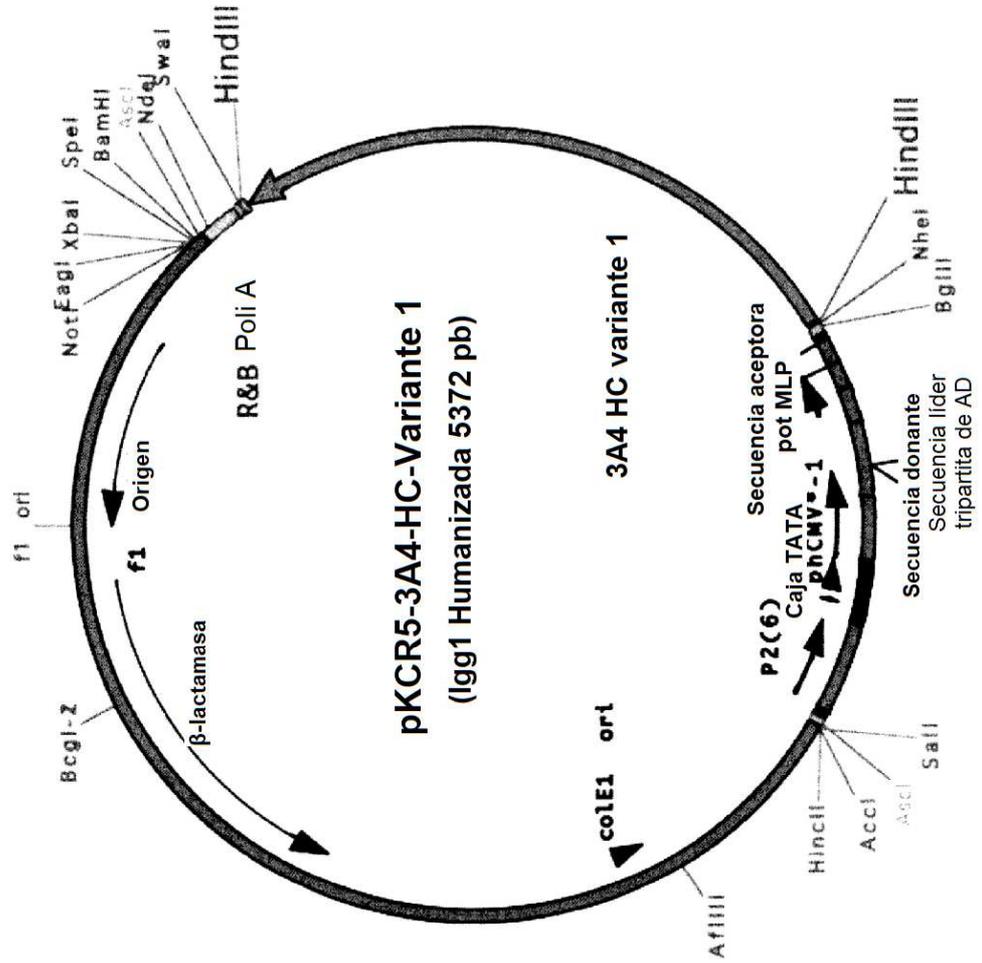
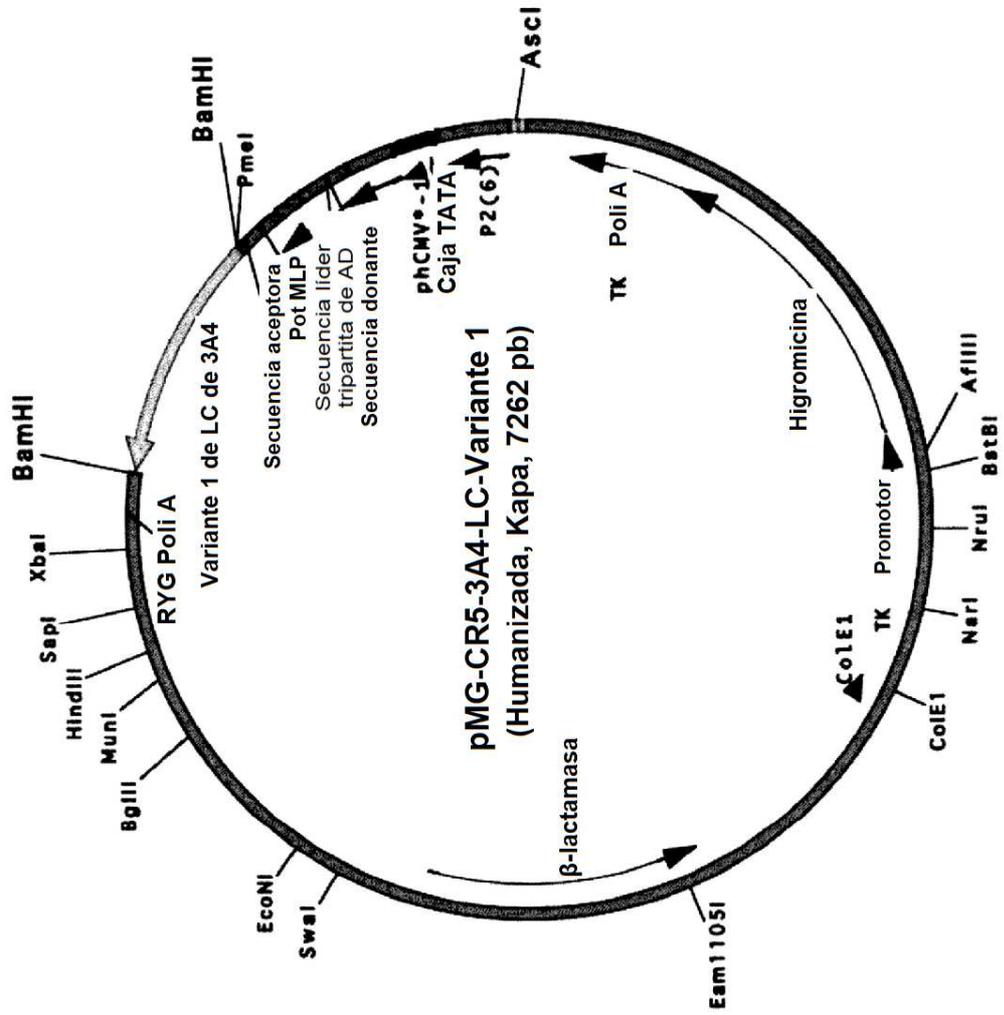


Figura 3b



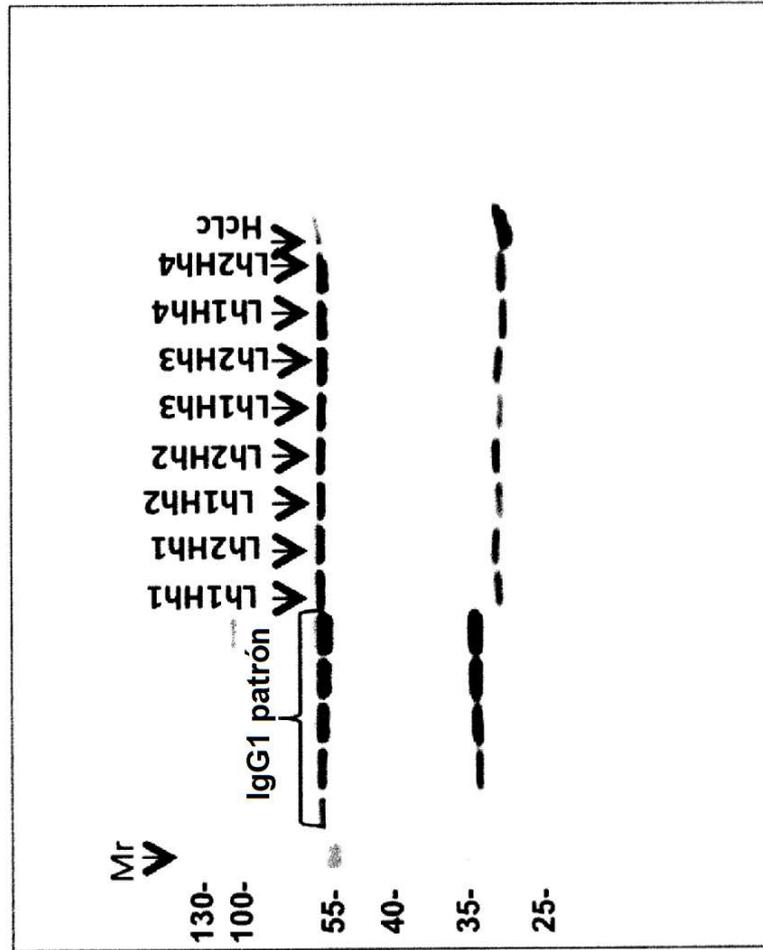


Figura 4

Figura 5

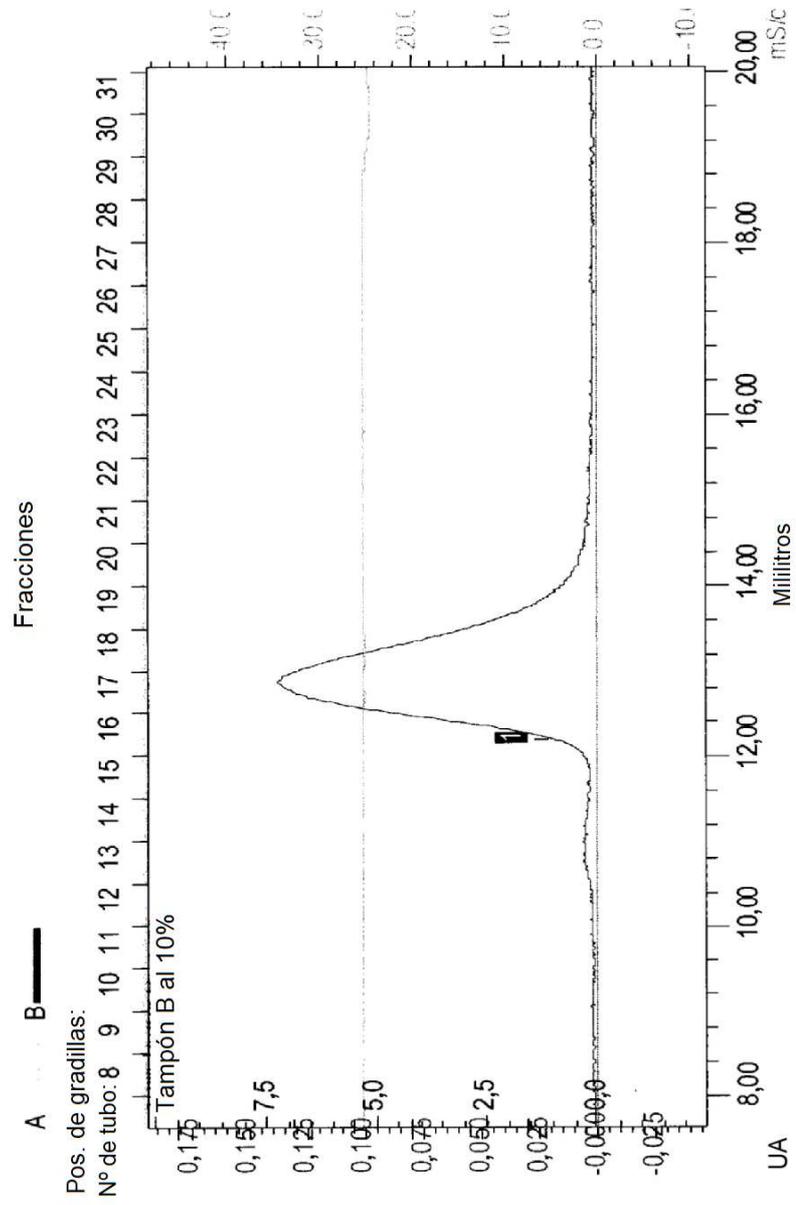


Figura 6

Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Kd (nM)	Veces de diferencia
LcHc	$7,72 \times 10^6$	$1,21 \times 10^{-4}$	0,016	-
Lh1Hh1	$6,93 \times 10^6$	$3,28 \times 10^{-3}$	0,474	29,6
Lh2Hh1	$6,97 \times 10^6$	$2,37 \times 10^{-3}$	0,341	21,3
Lh1Hh2	$5,65 \times 10^6$	$1,19 \times 10^{-3}$	0,211	13,2
Lh2Hh2	$7,40 \times 10^6$	$1,81 \times 10^{-3}$	0,245	15,3
Lh1Hh3	$6,46 \times 10^6$	$9,60 \times 10^{-4}$	0,149	9,3
Lh2Hh3	$4,46 \times 10^6$	$1,02 \times 10^{-3}$	0,228	14,3
Lh1Hh4	$5,14 \times 10^6$	$7,64 \times 10^{-4}$	0,149	9,3
Lh2Hh4	$4,57 \times 10^6$	$4,70 \times 10^{-4}$	0,103	6,4

Figura 7a

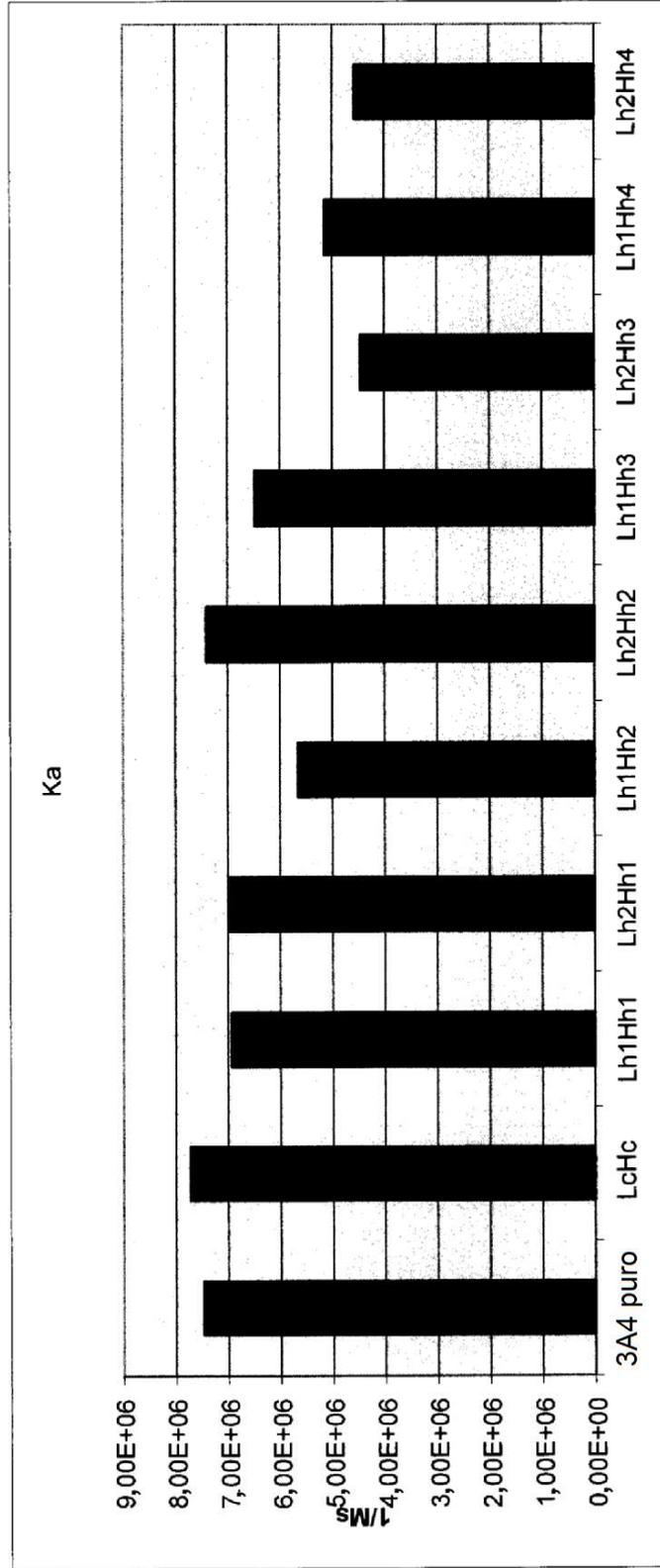


Figura 7b

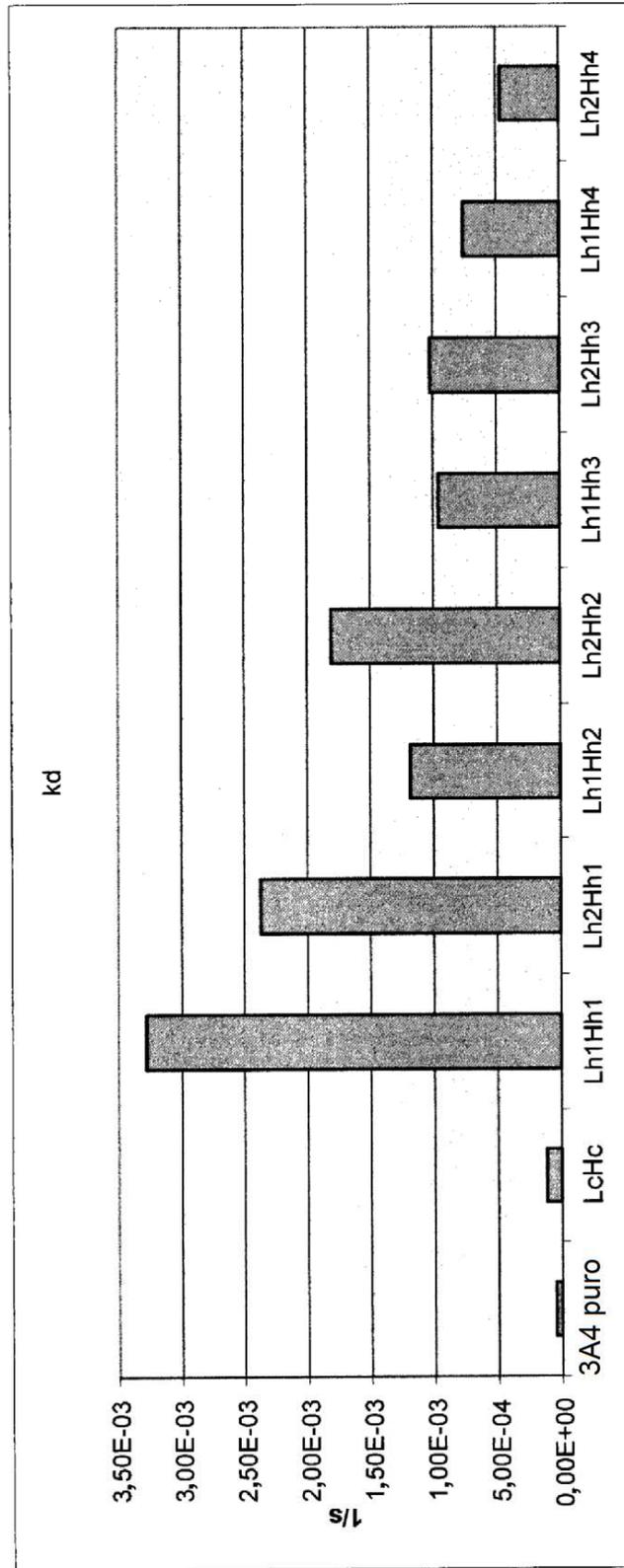


Figura 7c

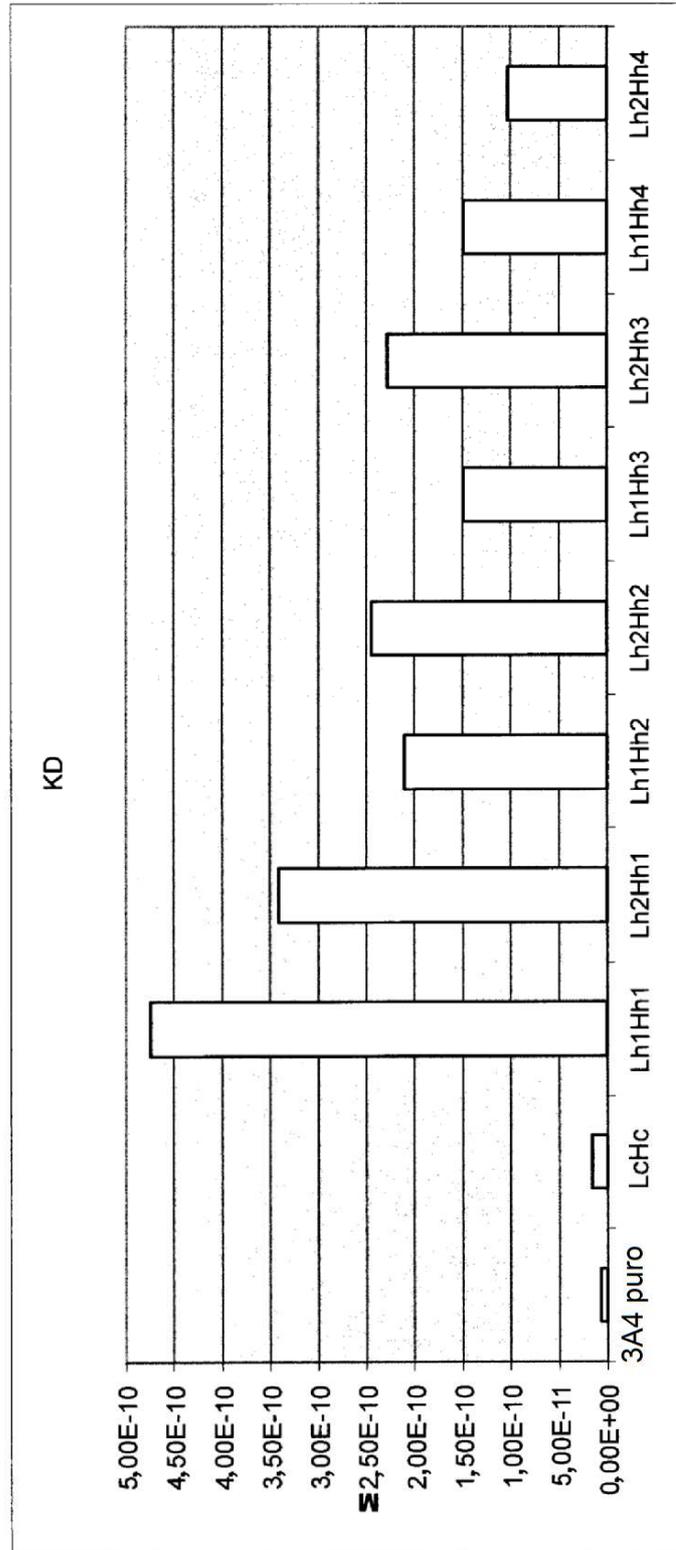


Figura 8a

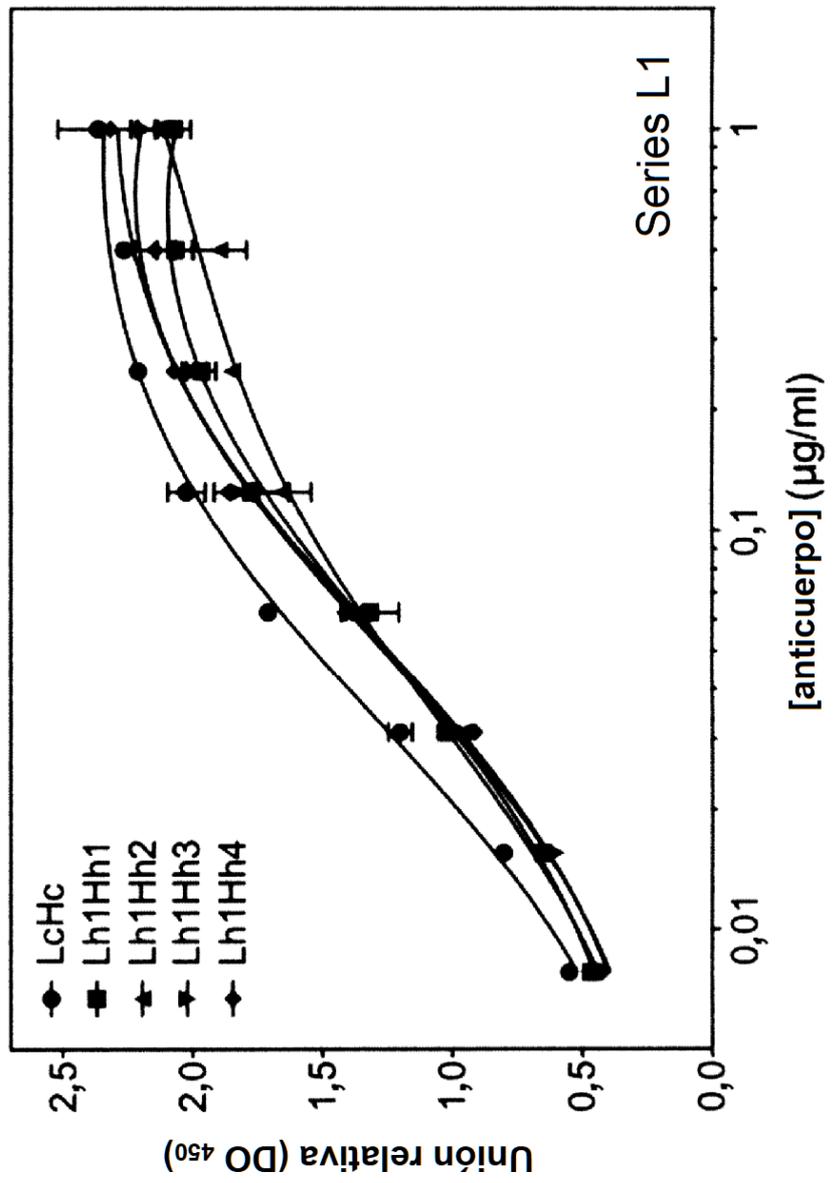


Figura 8b

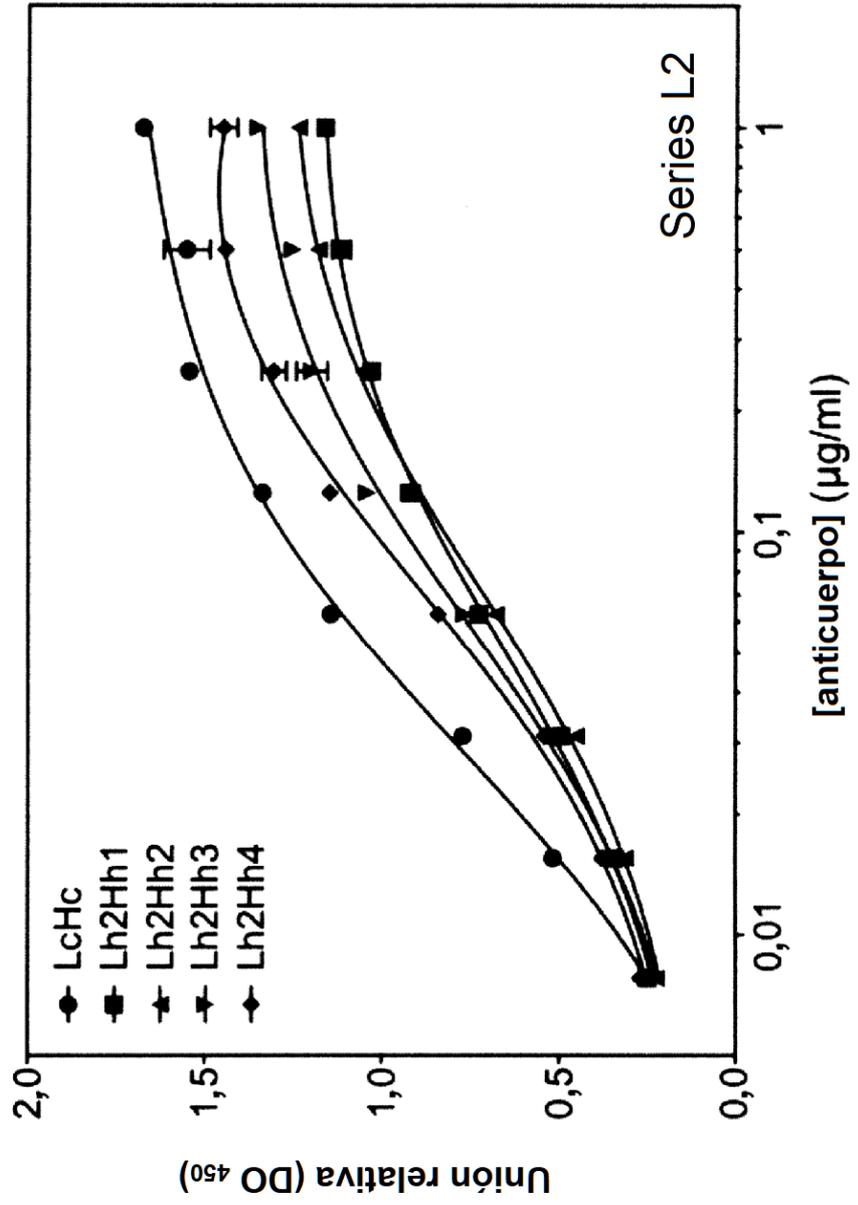


Figura 9

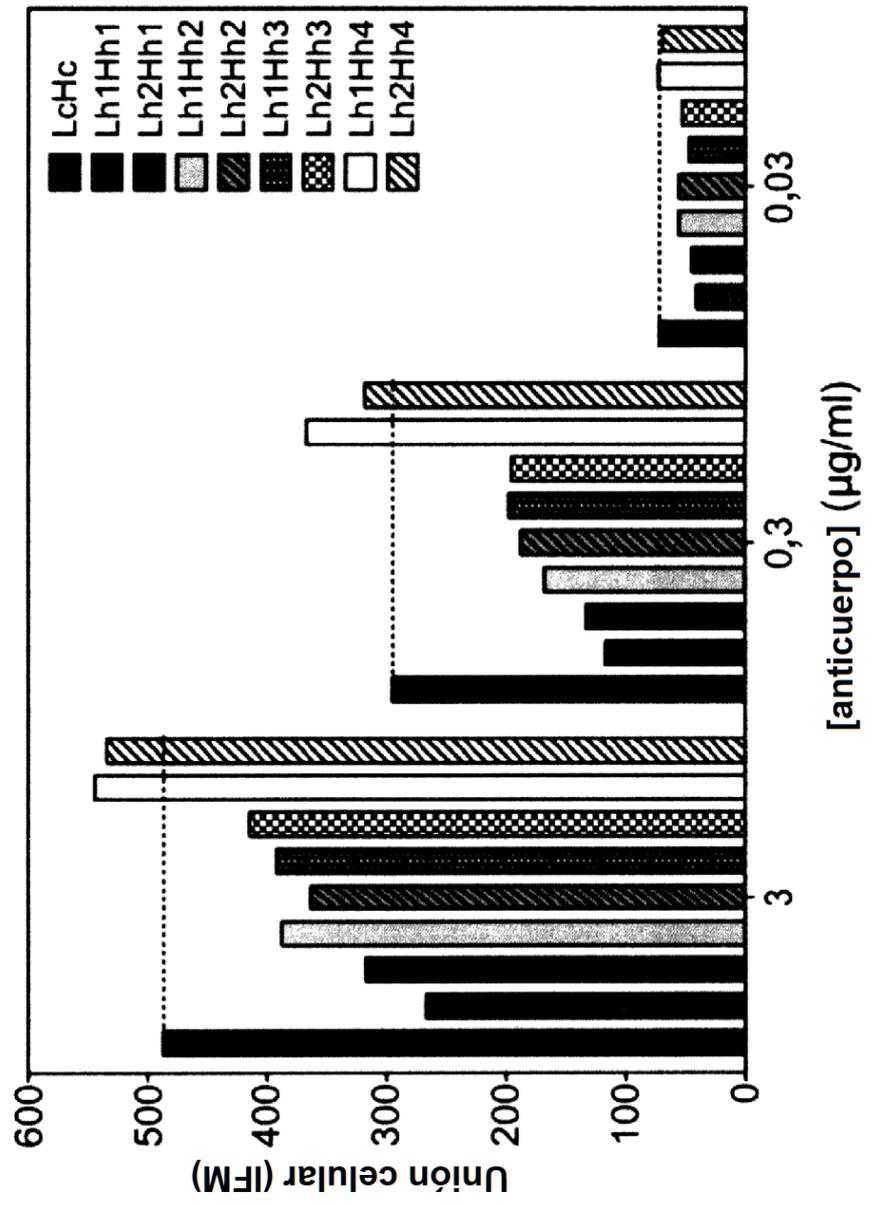
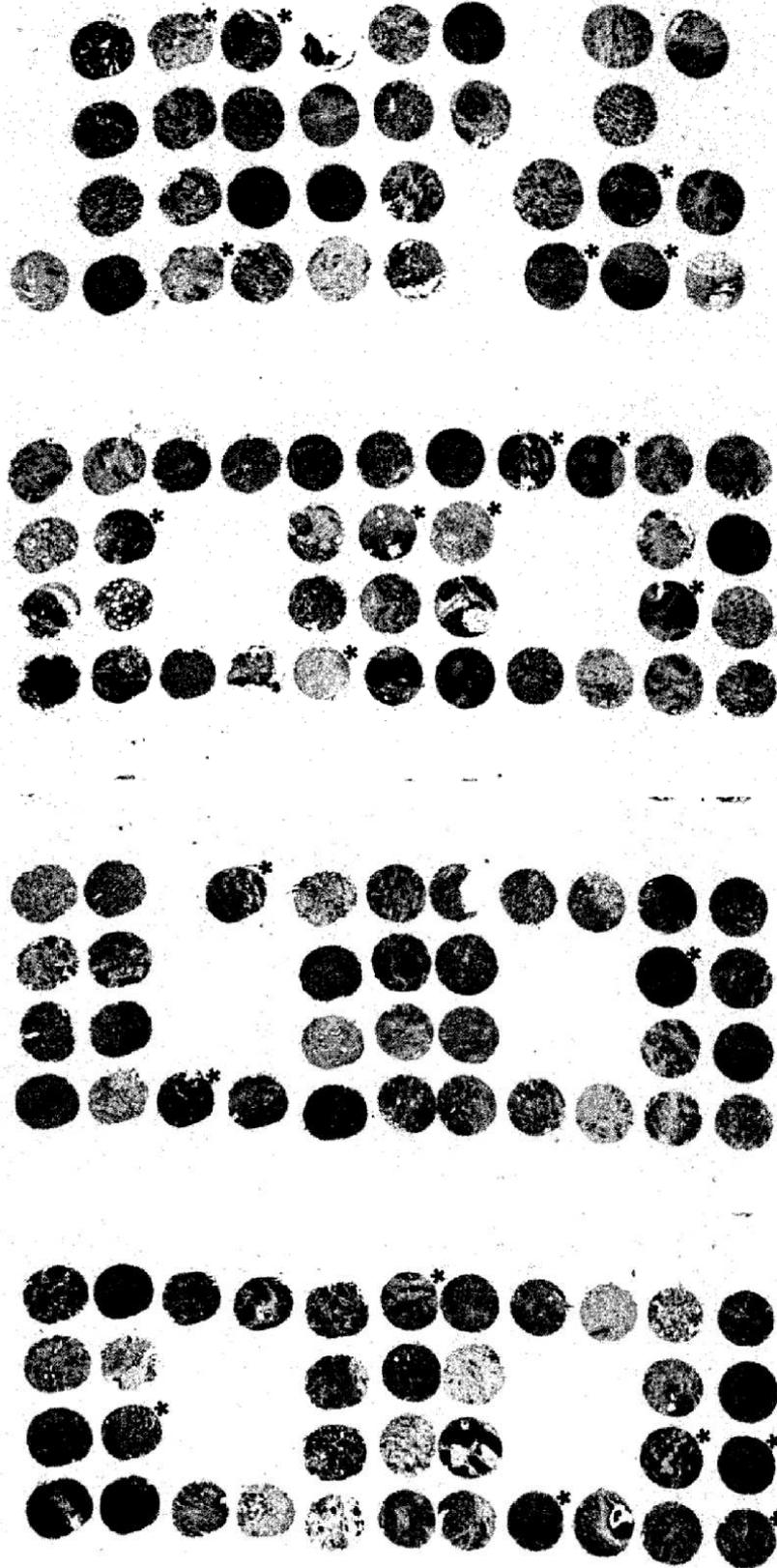


Figura 10



*, Muestras de TNBC

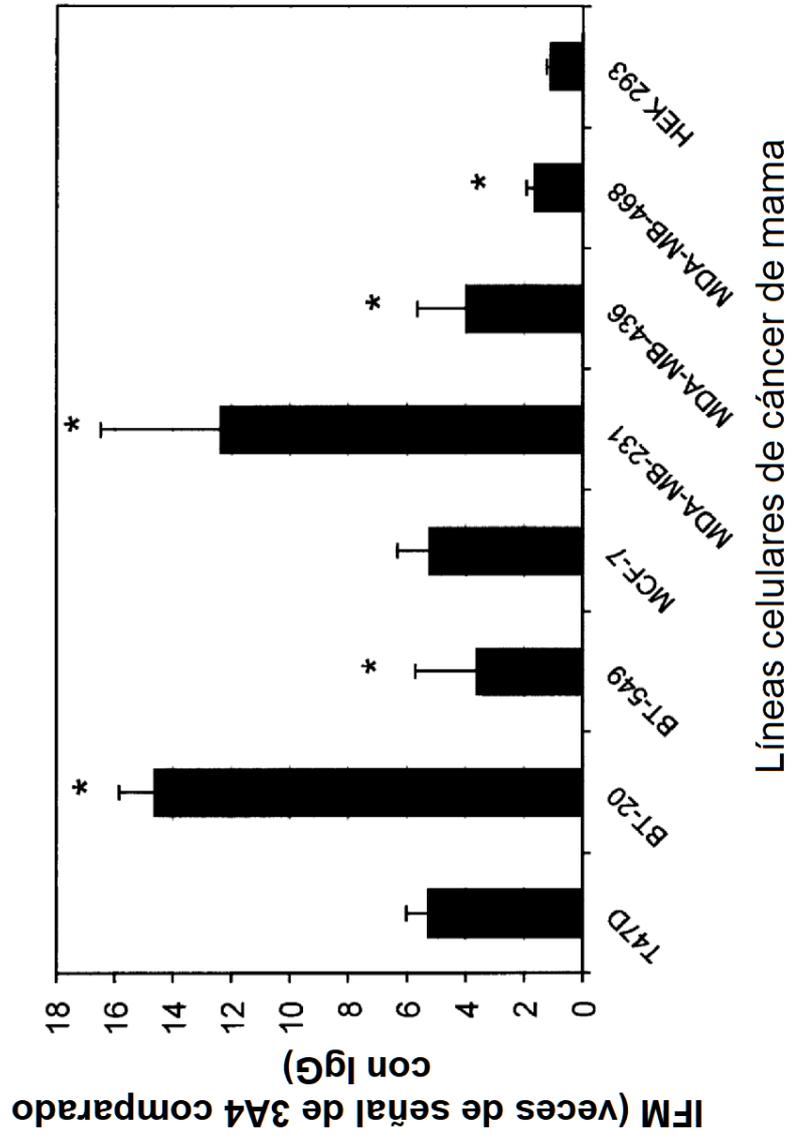


Figura 11

Figura 12

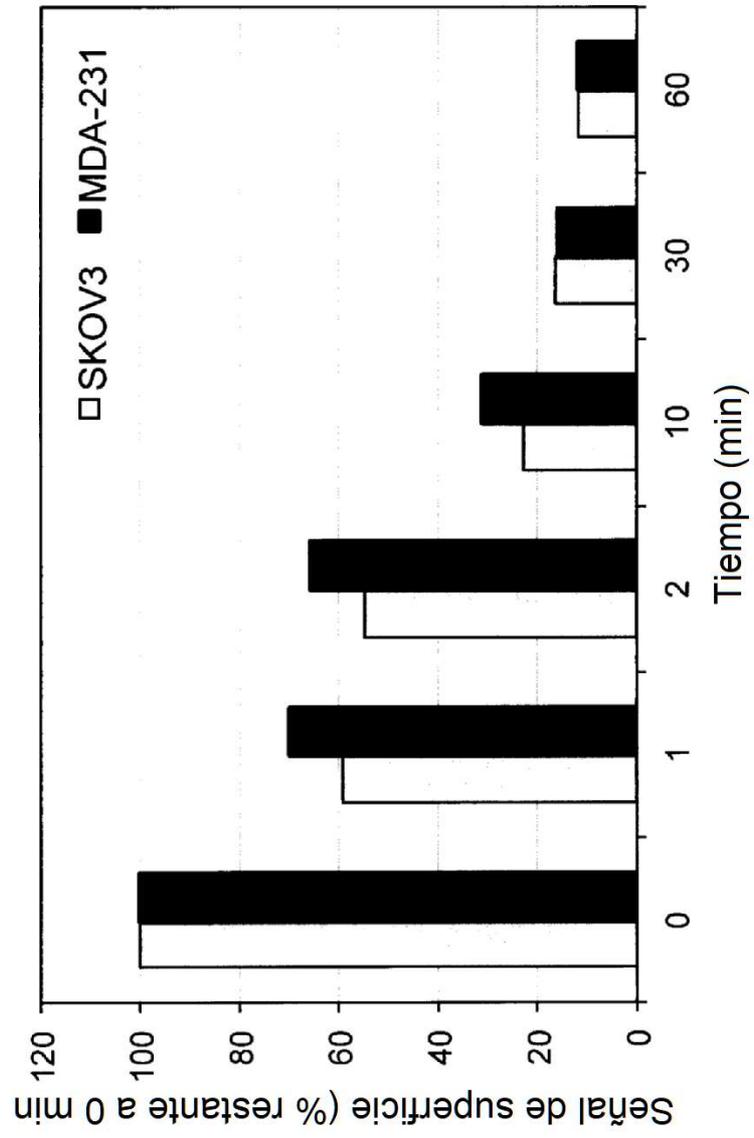


Figura 13

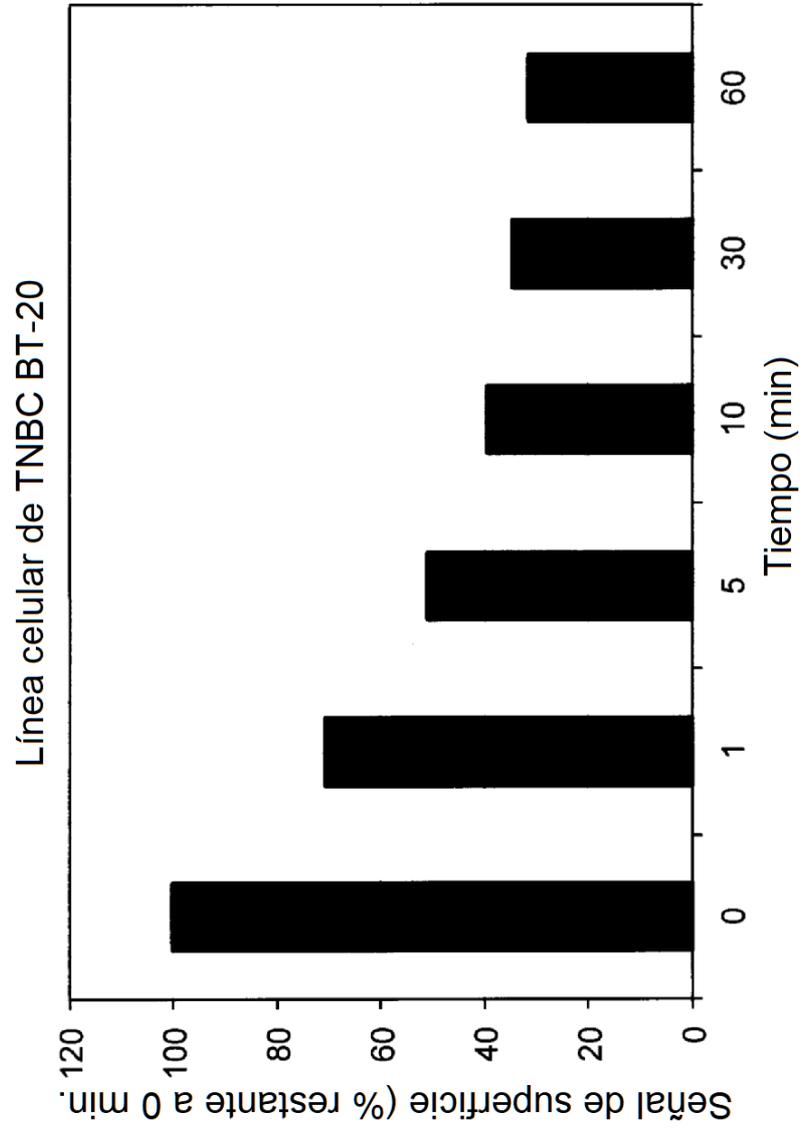


Figura 14

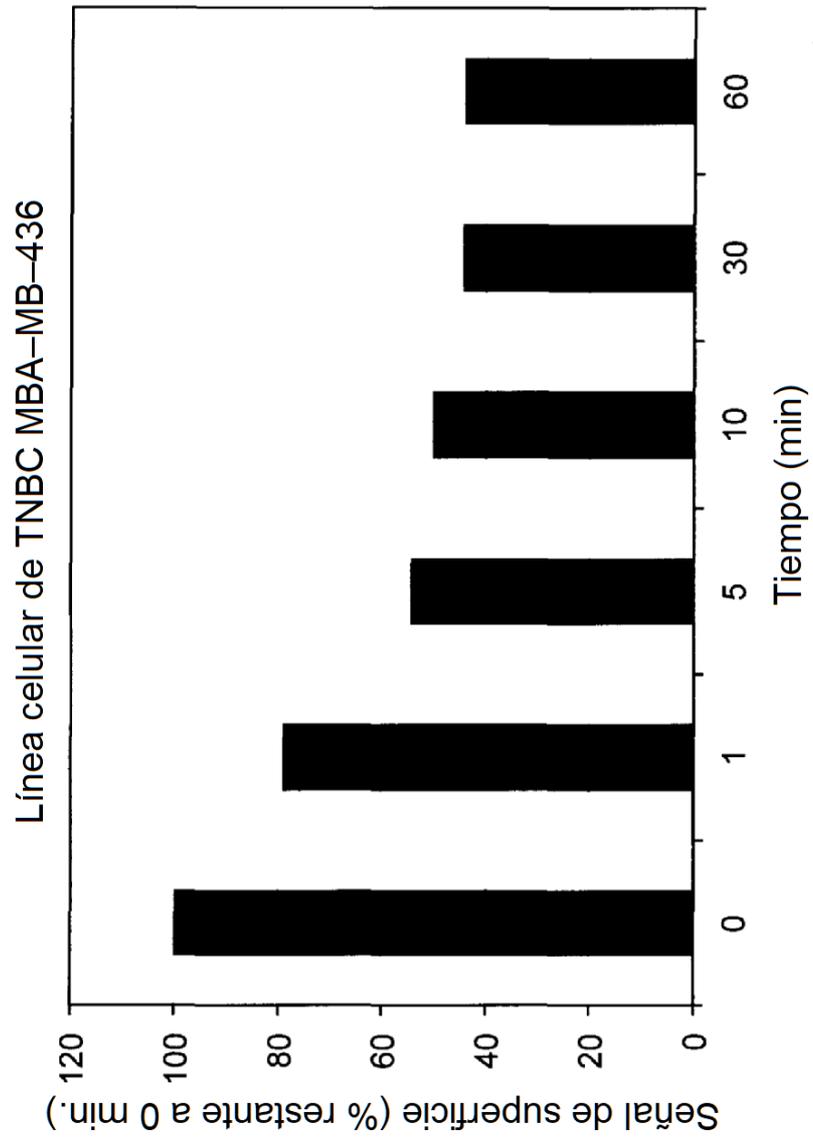


Figura 15

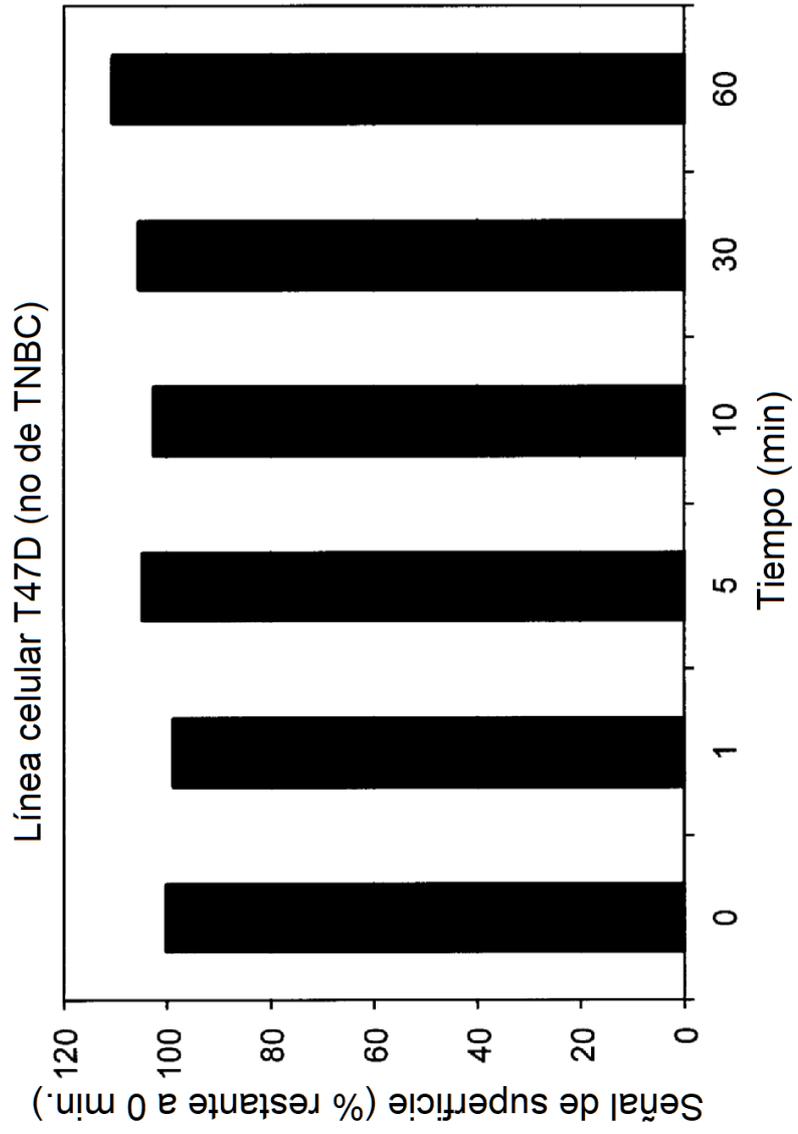


Figura 16

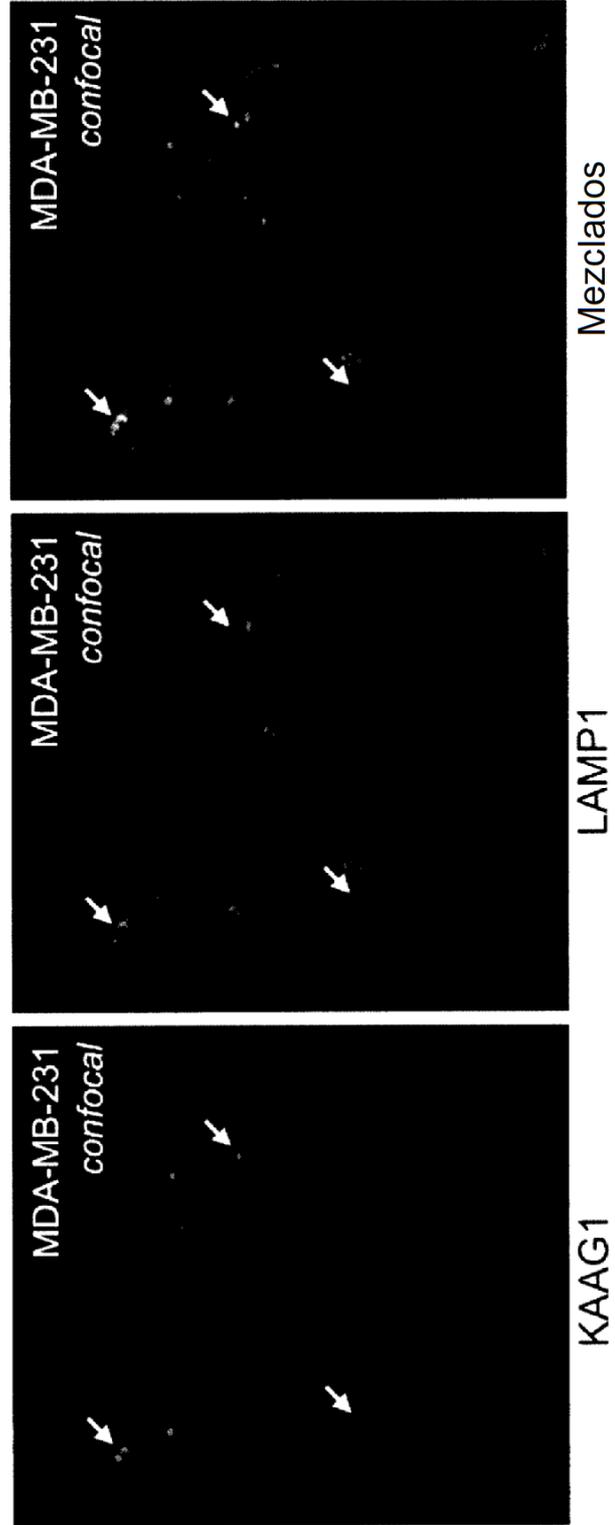


Figura 17

