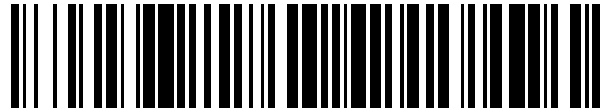


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 913**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012 E 16190193 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3173427**

54 Título: **Anticuerpos contra el antígeno 1 asociado al riñón y fragmentos de unión al antígeno de los mismos**

30 Prioridad:

31.03.2011 US 201161470063 P

12.09.2011 US 201161533346 P

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

21.02.2020

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.;

SULEA, TRAIAN y

FILION, MARIO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 743 913 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el antígeno 1 asociado al riñón y fragmentos de unión al antígeno de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos específicos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente al antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1) y a su uso para el tratamiento, la detección y el diagnóstico del cáncer. Se contempla en particular el suministro de un agente terapéutico a células con estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno.

Antecedentes de la invención

Entre las neoplasias ginecológicas, el cáncer de ovario es el responsable del índice de mortalidad más elevado relacionado con tumores en las mujeres de los Estados Unidos (Jemal *et al.*, 2005). Es la cuarta causa principal de defunción relacionada con el cáncer en las mujeres de los Estados Unidos (Menon *et al.*, 2005). La Sociedad Americana Contra el Cáncer estimó un total de 22 220 nuevos casos en 2005 y atribuyó 16 210 muertes a la enfermedad (Bonome *et al.*, 2005). Durante los últimos 30 años, las estadísticas se han mantenido básicamente inalteradas - la mayoría de mujeres que desarrollen un cáncer de ovario, fallecerán debido a esta enfermedad (Chambers y Vanderhyden, 2006). La enfermedad conlleva un riesgo de por vida de 1:70 y un índice de mortalidad > 60% (Chambers y Vanderhyden, 2006). El elevado índice de mortalidad se debe a las dificultades relacionadas con una detección temprana del cáncer de ovario cuando la neoplasia ya se ha extendido más allá del ovario. De hecho, a más de un 80% de los pacientes se les diagnostica un estadio avanzado de la enfermedad (estadio III o IV) (Bonome *et al.*, 2005). Estos pacientes tienen una prognosis deficiente, que se manifiesta en un índice de supervivencia de 5 años < 45%, aunque de un 80% a un 90% responderán inicialmente a la quimioterapia (Berek *et al.*, 2000). Este éxito mayor, en comparación con un índice de supervivencia de 5 años de un 20% previamente se debe, al menos en parte, a la capacidad para reducir de forma óptima el tejido tumoral cuando se encuentra confinado en los ovarios, lo cual supone un factor de pronóstico significativo para el cáncer de ovario (Bristow R. E., 2000; Brown *et al.*, 2004). Los pacientes a los que se les diagnostica la enfermedad en un estadio inicial (estadio I), el índice de supervivencia de 5 años es de > 90 (Chambers y Vanderhyden, 2006).

El cáncer de ovario comprende un grupo heterogéneo de tumores que derivan del epitelio superficial del ovario o de inclusiones superficiales. Se clasifican en tipo seroso, mucinoso, endometriode, de células claras y de Brenner (transitorio), que se corresponden con los diferentes tipos de epitelios en los órganos del aparato reproductor femenino (Shih y Kurman, 2005). De entre ellos, los tumores serosos constituyen ~60% de los casos de cáncer de ovario diagnosticados. Cada subcategoría histológica se divide adicionalmente en tres grupos: benigno, intermedio (tumor frontera o de bajo potencial maligno (BPM)) y maligno, que reflejan su comportamiento clínico (Seidman *et al.*, 2002). Los tumores BPM representan de un 10% a un 15% de los tumores que se diagnostican como serosos y suponen un dilema, ya que manifiestan una estructura nuclear y un comportamiento metastásico atípicos, y aún así son considerablemente menos agresivos que los tumores serosos de grado elevado. La supervivencia de 5 años para los pacientes con tumores BPM es de un 95%, a diferencia de la supervivencia < 45% para la enfermedad avanzada de grado elevado durante el mismo periodo (Berek *et al.*, 2000).

En la actualidad, el diagnóstico del cáncer de ovario se lleva a cabo, en parte, mediante un análisis rutinario de la historia médica de los pacientes y realizando exámenes físicos, de ultrasonidos y rayos X, así como también cribados hematológicos. Se han descrito dos estrategias alternativas para la detección hematológica temprana de biomarcadores en suero. Una estrategia consiste en el análisis de muestras de suero mediante espectrometría de masas en busca de proteínas o fragmentos proteicos de identidad desconocida que detecten la presencia o ausencia de cáncer (Mor *et al.*, 2005; Kozak *et al.*, 2003). Sin embargo, esta estrategia resulta costosa y su disponibilidad no es generalizada. Como alternativa, la presencia o ausencia de proteínas/péptidos conocidos en el suero se está detectando utilizando micromatrices de anticuerpos, ELISA u otras estrategias similares. La evaluación del suero en busca de un biomarcador proteico denominado CA-125 (antígeno-125 del cáncer) se ha llevado a cabo de forma generalizada desde hace mucho tiempo como un marcador para el cáncer de ovario. Sin embargo, aunque las células de cáncer de ovario pueden producir un exceso de estas moléculas proteicas, existen otros tipos de cáncer diferentes, que incluyen el cáncer de las trompas de Falopio o el cáncer de endometrio (cáncer del revestimiento del útero), un 60% de pacientes con cáncer pancreático y un 20-25% de pacientes con otras neoplasias, con niveles elevados de CA-125. La prueba de CA-125 solo proporciona un resultado positivo verdadero para aproximadamente un 50% de pacientes con cáncer de ovario de estadio I y presenta una probabilidad de un 80% de proporcionar resultados positivos verdaderos para pacientes con cáncer de ovario de estadio II, III y IV. El 20% restante de los pacientes con cáncer de ovario no muestran ningún incremento de las concentraciones de CA-125. Además, una prueba con una concentración elevada de CA-125 puede indicar otra actividad benigna no asociada con el cáncer, tal como menstruación, embarazo o endometriosis. Como consecuencia, esta prueba tiene una aplicación clínica muy limitada para la detección de una enfermedad en estadio inicial cuando todavía se puede tratar, ya que exhibe un valor predictivo positivo (VPP) < 10%. Incluso con la adición de un cribado de ultrasonidos para CA-125, el VPP solo mejora hasta aproximadamente un 20% (Kozak *et al.*, 2003). Por lo tanto, esta prueba no representa una prueba de cribado eficaz.

A pesar de un mayor conocimiento de la etiología de la enfermedad, cirugía citorrreductiva agresiva y quimioterapia combinada moderna, solo se ha producido un pequeño cambio en el índice de mortalidad. Los resultados insatisfactorios se han atribuido a (1) la falta de pruebas de cribado adecuadas para la detección temprana de la enfermedad combinada con una presentación tan solo sutil de los síntomas en este estadio - el diagnóstico se realiza frecuentemente tan solo después de la evolución hacia estadios posteriores, momento en el cual la diseminación peritoneal del cáncer limita el tratamiento eficaz y (2) el desarrollo frecuente de resistencia a estrategias quimioterapéuticas estándar, lo cual limita la mejora del índice de supervivencia de 5 años de los pacientes. El régimen de quimioterapia inicial para el cáncer de ovario incluye la combinación de carboplatino (Paraplatin) y paclitaxel (taxol). Varios años de ensayos clínicos han demostrado que esta combinación es la más eficaz tras una cirugía eficaz - reduce el volumen del tumor aproximadamente un 80% en las mujeres a las que se ha diagnosticado cáncer de ovario recientemente y de un 40% a un 50% presentarán una regresión completa - pero se continúan realizando estudios en busca de formas para mejorar la respuesta de los pacientes. La infusión abdominal reciente de agentes quimioterapéuticos que tienen como diana células difíciles de alcanzar, combinada con un suministro intravenoso, ha incrementado la eficacia. Sin embargo, a menudo los efectos secundarios graves provocan que no se complete el curso del tratamiento. Algunos agentes quimioterapéuticos diferentes incluyen doxorubicina, cisplatino, ciclofosfamida, bleomicina, etopósido, vinblastina, clorhidrato de topotecán, ifosfamida, 5-fluorouracilo y melfalán. Más recientemente, algunos ensayos clínicos han demostrado que la administración intraperitoneal de cisplatino confiere un beneficio en cuanto a la supervivencia en comparación con la quimioterapia intravenosa sistémica (Cannistra y McGuire, 2007). Los excelentes índices de supervivencia para mujeres con una enfermedad en estadio inicial que reciben quimioterapia proporcionan un argumento convincente para que los esfuerzos de investigación se centren en desarrollar estrategias para mejorar la detección del cáncer de ovario. Además, el descubrimiento de nuevos biomarcadores relacionados con el cáncer de ovario conducirá al desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces con efectos secundarios mínimos para el tratamiento futuro del cáncer de ovario.

A pesar de estos recientes avances en la comprensión y el tratamiento del cáncer de ovario, el uso de quimioterapia está asociado de forma invariable con reacciones adversas severas, las cuales limitan su uso. Como consecuencia, se necesitan estrategias más específicas, tales como la combinación de la especificidad tisular del antígeno con la selectividad de anticuerpos monoclonales, las cuales deberían permitir una reducción significativa de los efectos secundarios no asociados con la diana. El uso de anticuerpos monoclonales para la terapia del cáncer de ovario está empezando a emerger y existe un número cada vez mayor de ensayos clínicos en curso (Oei *et al.*, 2008; Nicodemus y berek, 2005). La mayoría de estos ensayos han examinado el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con radioisótopos, tales como itrio-90, o anticuerpos que tienen como diana antígenos tumorales ya identificados en otros tipos de cáncer. Un ejemplo de esto es el uso de bevacizumab, que tiene como diana el factor de crecimiento endotelial vascular (Burger, 2007). Existen muy pocos antígenos específicos del cáncer de ovario que se estén investigando actualmente como dianas terapéuticas para anticuerpos monoclonales. Algunos ejemplos incluyen el uso de una proteína denominada B7-H4 (Simon *et al.*, 2006) y más recientemente el receptor alfa folato (Ebel *et al.*, 2007), el último de los cuales ha entrado recientemente en la fase II de los ensayos clínicos.

El antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1) se clonó originariamente a partir de una genoteca de ADNc derivada de una línea celular de carcinoma renal del antígeno B7 para leucocitos de histocompatibilidad como un péptido antigénico presentado a linfocitos T citotóxicos (Van den Eynde *et al.*, 1999; N.º de acceso a Genebank Q9UBP8, SEQ ID NOs:28, 29). Se descubrió que el locus que contenía *KAAG1* codificaba dos genes que se transcribían en hebras opuestas del ADN. Se descubrió que la hebra sentido codificaba un transcrito que codificaba una proteína denominada *DCDC2*. Los estudios de expresión de estos autores determinaron que el transcrito antisentido *KAAG1* era específico del tumor y presentaba muy poca expresión en tejidos normales, mientras que el transcrito sentido *DCDC2* se expresaba de forma ubicua (Van den Eynde *et al.*, 1999). La expresión del transcrito *KAAG1* en el cáncer, y en particular en cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma, se ha descrito en la solicitud de patente publicada N.º PCT/CA2007/001134 (publicada como WO 2007/147265 A1). Van den Eynde *et al.* también observaron la expresión de ARN en carcinomas renales, carcinomas colorrectales, melanomas, sarcomas, leucemias, tumores cerebrales, tumores de tiroides, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas esofágicos, tumor de vejiga, carcinomas de pulmón y tumores de cabeza y cuello. Recientemente, pruebas genéticas contundentes obtenidas a partir de estudios de desequilibrio de ligamento demostraron que el locus *VMP/DCDC2/KAAG1* estaba asociado con la dislexia (Schumacher *et al.*, 2006; Cope *et al.*, 2005). Uno de estos informes señaló al marcador *DCDC2* como la causa en pacientes con dislexia, debido a que la función de esta proteína en la migración de neuronas corticales era acorde con los síntomas de estos pacientes, que a menudo presentaban una migración y maduración neuronales anómalas (Schumacher *et al.*, 2006). El documento WO2013/104050A2 indica que las células de cáncer de mama que carecen de expresión de proteína ER, expresión de proteína PgR y/o que muestran ausencia de sobreexpresión de proteína HER2 (es decir, células de cáncer de mama triples negativas, de tipo basal) pueden ser dianas eficaces de un anticuerpo anti *KAAG1* y destruirse tras el suministro de un resto terapéutico. Este documento queda bajo el Artículo 54(3) EPC.

Compendio de la invención

La invención se refiere a anticuerpos anti-*KAAG1* específicos y fragmentos de unión al antígeno, y a su uso para el tratamiento, la detección y el diagnóstico de cáncer que comprende células tumorales que expresan *KAAG1* o una

variante de KAAG1. Las realizaciones ilustrativas de un cáncer de este tipo incluyen, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer renal, cáncer colorrectal, sarcoma, leucemia, cáncer cerebral, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del esófago, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón y cáncer de cabeza y cuello.

5 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser particularmente eficaces a la hora de actuar sobre KAAG1 o una variante de KAAG1 que se exprese en la superficie de las células tumorales.

De hecho, parece ser que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención presentan una mayor capacidad de unión a las células tumorales que expresan KAAG1 en comparación con, por ejemplo, los anticuerpos 3D3 y 3G10 descritos en el documento PCT/CA2009/001586 (publicado como WO 2010/060186). Estos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno están además interiorizados y, por consiguiente, pueden ser útiles para suministrar agentes terapéuticos a células tumorales. Los resultados de la presente sugieren que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que tienen las características deseadas (p. ej., una interiorización y unión mejoradas) se unen generalmente a una región C-terminal de KAAG1 delimitada por los aminoácidos 61-84. Sin embargo, aunque los dos anticuerpos 3A4 y 3G10 se unen a la misma región, parece ser que el anticuerpo 3A4 se une a la superficie de las células tumorales de forma más eficaz que el anticuerpo 3G10. En particular, las células cancerosas que expresan el antígeno KAAG1 requieren aproximadamente 10 veces menos 3A4 en comparación con 3G10 en los experimentos de citometría de flujo, una estrategia que mide la unión directa de los anticuerpos a la superficie de las células. Además, en experimentos de unión utilizando resonancia de plasmones superficiales, se descubrió que la afinidad de 3A4 por KAAG1 era inferior a 10 picomolar, mientras que los anticuerpos 3D3 y 3G10 presentaban afinidades superiores a 200 nanomolar (una afinidad 20 veces inferior). Por consiguiente, cabe esperar que estos incrementos de la capacidad de unión de 3A4 se traduzcan en una actividad terapéutica mejorada.

La presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de este que es capaz de unirse específicamente al antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1) y tener una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDRH1 expuesta en la SEQ ID NO.:5, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 expuesta en la SEQ ID NO.:6 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3 expuesta en la SEQ ID NO.:7 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDRL1 expuesta en la SEQ ID NO.:8, la secuencia de CDRL2 expuesta en la SEQ ID NO.:9 y la secuencia de aminoácidos de CDRL3 expuesta en la SEQ ID NO.:10, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende regiones marco conservadas humanas y opcionalmente una o más retromutaciones en la región variable de cadena ligera y/o región variable de cadena pesada, en donde la o las retromutaciones están en la región marco conservada y corresponden a aminoácidos de marco conservado hallados en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO.:2 y/o en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO.:4 del anticuerpo de ratón parental.

La presente invención también proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo capaz de unirse específicamente al antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1), en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO.:35, SEQ ID NO.:36 o SEQ ID NO.:37 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31 o SEQ ID NO.:32.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este de la invención.

La presente invención también proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de la invención.

La presente invención también proporciona una célula aislada que comprende:

50 a. un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este de la invención y un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este de la invención, en donde cada ácido nucleico está un vector separado o en el mismo vector; o

55 b. el anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este de la invención.

La presente invención también proporciona una composición o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este de la invención, en donde dicha composición comprende además un portador y en donde dicha composición farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un kit que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este de la invención.

65 La presente invención también proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este de la invención o una composición o composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento, detección o

diagnóstico del cáncer que comprende células que expresan KAAG1 o una variante de KAAG1.

La presente invención también proporciona un método de ADN recombinante para realizar el anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este de la invención, que comprende cultivar una célula aislada de la invención de modo que se produce el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este

Se exponen en las reivindicaciones realizaciones preferidas de la invención.

En la presente se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aislado o sustancialmente purificado que puede tener la capacidad de unirse de forma específica a una secuencia que sea idéntica a al menos 10 (p. ej., de 10 a 20 o más) aminoácidos consecutivos situados entre los aminoácidos 61 y 84 de KAAG1 (SEQ ID NO.:29).

También se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno aislados capaces de competir con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en la presente.

En la presente se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en la presente. Tales anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden adoptar la forma de anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos (aislados), así como también fragmentos de unión al antígeno que tengan las características que se describen en la presente. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención son anticuerpos humanizados o fragmentos de unión al antígeno de este. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que contienen permutaciones de las cadenas ligera y/o pesada entre un anticuerpo monoclonal, quimérico, humanizado o humano también se engloban en la presente.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención pueden comprender aminoácidos de una región constante humana y aminoácidos del marco de un anticuerpo humano. EL anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la presente invención comprenden aminoácidos del marco de un anticuerpo humano.

El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto, anticuerpos monoclonales o policlonales. El término "anticuerpo" también engloba anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos humanos normalmente están constituidos por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende regiones variables y regiones constantes. La región variable de la cadena ligera comprende 3 CDR, que se identifican en la presente como CDRL1 o L1, CDRL2 o L2 y CDRL3 o L3, flanqueadas por regiones marco. La región variable de la cadena pesada comprende 3 CDR, que se identifican en la presente como CDRH1 o H1, CDRH2 o H2 y CDRH3 o H3, flanqueadas por regiones marco. Las CDR de los anticuerpos humanizados de la presente invención se han identificado utilizando las definiciones de Kabat y Chotia (p. ej., CDRH2 expuesta en SEQ ID NO.:56). Sin embargo, otros (Abhinandan y Martin, 2008) han utilizado estrategias modificadas basadas de forma general en Kabat y Chotia que han dado como resultado la delineación de CDR más cortas (p. ej., CDRH2 expuesta en SEQ ID NO.:6).

La expresión "fragmento de unión al antígeno", tal como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantienen la capacidad de unirse a un antígeno (p. ej., KAAG1, una forma secretada de KAAG1 o sus variantes). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser ejecutada por fragmentos de un anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de unión englobados en la expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por 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 puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd constituido por los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv constituido por los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que está constituido por un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR), p. ej., CDR3 de V_H . Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes diferentes, estos se pueden unir utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permita prepararlos como una cadena polipeptídica única en la que las regiones V_L y V_H se apareen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); remítase, p. ej., a Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena única queden englobados en la expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Además, los fragmentos de unión al antígeno incluyen proteínas de fusión de la inmunoglobulina del dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido del dominio de unión (tal como una región variable de la cadena pesada, una región variable de la cadena ligera o una región variable de la cadena pesada fusionada con una región variable de la cadena ligera mediante un péptido conector) que está fusionado con un polipéptido de la región bisagra de la inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. La región bisagra se puede modificar reemplazando uno o más residuos de cisteína por residuos de serina para evitar la dimerización. Tales proteínas de fusión de la inmunoglobulina del dominio de unión se describen adicionalmente en US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

5 La expresión "anticuerpo humanizado" engloba un anticuerpo totalmente humanizado (es decir, los marcos están humanizados al 100%) y un anticuerpo parcialmente humanizado (p. ej., al menos un dominio variable contiene uno o más aminoácidos de un anticuerpo humano, mientras que otros aminoácidos son aminoácidos de un anticuerpo progenitor no humano). Normalmente, un "anticuerpo humanizado" contiene CDR de un anticuerpo progenitor no humano (p. ej., de ratón, rata, conejo, primate no humano, etc.) y marcos que son idénticos a los de un anticuerpo humano natural o de un anticuerpo humano consenso. En este caso, estos "anticuerpos humanizados" se clasifican como totalmente humanizados. Un "anticuerpo humanizado" también puede contener una o más sustituciones de aminoácidos que no se correspondan con las del anticuerpo humano o anticuerpo humano consenso. Tales sustituciones incluyen, por ejemplo, retromutaciones (p. ej., la reintroducción de aminoácidos no humanos) que permitan conservar las características del anticuerpo (p. ej., afinidad, especificidad, etc.). Tales sustituciones se encuentran normalmente en la región marco. Un "anticuerpo humanizado" también comprende opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc), que es habitualmente la de un anticuerpo humano. Normalmente, la región constante de un "anticuerpo humanizado" es idéntica a la de un anticuerpo humano.

15 La expresión "anticuerpo humano natural" se refiere a un anticuerpo codificado (codificable) por el conjunto de anticuerpos humanos, es decir, la secuencia de la línea germinal.

20 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones variables no humanas y una región constante humana.

25 La expresión "anticuerpo híbrido" se refiere a un anticuerpo que comprende una de sus regiones variables de la cadena ligera o pesada (su cadena ligera o pesada) de un tipo determinado de anticuerpo (p. ej., humanizado), mientras que la otra región variable de la cadena ligera o pesada (la cadena ligera o pesada) es de otro tipo (p. ej., de murino, quimérica).

30 En algunas realizaciones, la región marco de la cadena ligera y/o la cadena pesada del anticuerpo humanizado puede comprender de uno a treinta aminoácidos del anticuerpo no humano que se desea humanizar y la porción restante es de un anticuerpo humano natural o un anticuerpo humano consenso. En algunos casos, el anticuerpo humanizado puede comprender de 1 a 6 CDR no humanas y a menudo las seis CDR no son humanas.

35 El anticuerpo humano natural seleccionado para la humanización del anticuerpo progenitor no humano puede comprender una región variable con una estructura tridimensional similar a la de (que se pueda superponer sobre) una región variable (modelada) de un anticuerpo progenitor no humano. En este sentido, el anticuerpo humanizado presenta una mayor probabilidad de tener una estructura tridimensional similar a la del anticuerpo progenitor no humano.

40 La región variable de la cadena ligera del anticuerpo humano natural seleccionado para la humanización puede presentar, por ejemplo, una identidad global (a lo largo de toda la región variable de la cadena ligera) de al menos un 70%, 75%, 80%, etc. con la del anticuerpo progenitor no humano. Como alternativa, la región marco de la cadena ligera del anticuerpo humano natural seleccionado para la humanización puede presentar, por ejemplo, una identidad secuencial de al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, etc. con la región marco de la cadena ligera del anticuerpo progenitor no humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo humano natural seleccionado para la humanización puede presentar el mismo o sustancialmente el mismo número de aminoácidos en su región determinante de la complementariedad de la cadena ligera que el de una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera del anticuerpo progenitor no humano.

45 La región variable de la cadena pesada del anticuerpo humano natural seleccionado para la humanización puede presentar, por ejemplo, una identidad global (a lo largo de toda la región variable de la cadena pesada) de al menos un 60%, 70%, 75%, 80%, etc. con la del anticuerpo progenitor no humano. También de acuerdo con la presente invención, los residuos aminoácidos de la región marco humana de la cadena pesada del anticuerpo humanizado pueden proceder de la región marco de la cadena pesada del anticuerpo humano natural y pueden presentar una identidad de al menos un 70%, 75%, 89%, etc. con una región marco de la cadena pesada del anticuerpo progenitor no humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo humano natural seleccionado para la humanización puede presentar el mismo o sustancialmente el mismo número de aminoácidos en su región determinante de la complementariedad de la cadena pesada que el de una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada del anticuerpo progenitor no humano.

50 El anticuerpo humano natural que se selecciona para la humanización del anticuerpo progenitor no humano puede comprender una región variable con una estructura tridimensional similar a la de (que se pueda superponer sobre) una región variable (modelada) de un anticuerpo progenitor no humano. En este sentido, el anticuerpo híbrido o humanizado presenta una mayor probabilidad de tener una estructura tridimensional similar a la del anticuerpo progenitor no humano.

65 Por ejemplo, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humano natural que se puede seleccionar para la humanización puede tener las siguientes características: **a)** una estructura tridimensional similar o idéntica a (que se

pueda superponer sobre) la de una cadena pesada del anticuerpo no humano y/o **b)** una región marco con una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de al menos un 70% respecto a una región marco de la cadena pesada del anticuerpo no humano. Opcionalmente, (un número de) residuos aminoácidos en una CDR de la cadena pesada (p. ej., las tres CDR) es igual o sustancialmente igual al de los residuos aminoácidos de la CDR de la cadena pesada no humana.

Como alternativa, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humano natural que se puede seleccionar para la humanización puede tener las siguientes características: **a)** una estructura tridimensional similar o idéntica a (que se pueda superponer sobre) la de una cadena ligera del anticuerpo no humano y/o **b)** una región marco con una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de al menos un 70% respecto a una región marco de la cadena ligera del anticuerpo no humano. Opcionalmente, (un número de) residuos aminoácidos en una CDR de la cadena ligera (p. ej., las tres CDR) es igual o sustancialmente igual al de los residuos aminoácidos de la CDR de la cadena ligera no humana.

Un sitio de unión al antígeno típico está constituido por las regiones variables formadas por el apareamiento de una inmunoglobulina de cadena ligera y una inmunoglobulina de cadena pesada. La estructura de las regiones variables del anticuerpo es muy uniforme y exhibe estructuras muy similares. Normalmente, estas regiones variables están constituidas por regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) relativamente homólogas intercaladas con tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). La actividad de unión global del fragmento de unión al antígeno está determinada a menudo por la secuencia de las CDR. Las FR suelen desempeñar una función en el posicionamiento y el alineamiento adecuados en tres dimensiones de las CDR para una unión al antígeno óptima.

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

El alcance, la aplicabilidad y las ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada no restrictiva que se proporciona a continuación en la presente. Sin embargo, se debe sobreentender que esta descripción detallada, a la vez que indica realizaciones ilustrativas de la invención, se proporciona solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra los resultados del ELISA que compara la unión del anticuerpo quimérico anti-KAAG1 3A4 con un anticuerpo de control cuando se incuban con concentraciones cada vez mayores de KAAG1 humano recombinante. La curva de unión de 3A4 se muestra con la línea de color más claro.

La **Figura 2** muestra un histograma que describe los resultados de los análisis de ELISA para mapear la especificidad por epítomos del anticuerpo anti-KAAG1 3A4. Los resultados mostraron que 3A4 interaccionó con una secuencia de aminoácidos contenida en el extremo terminal carboxi de KAAG1 entre los aminoácidos 61–84. La unión de 3A4 se comparó con los anticuerpos anti-KAAG1 3C4, 3D3 y 3G10, que se sabía que interaccionaban con las regiones 1–35, 36–60 y 61–84 de KAAG1, respectivamente.

La **Figura 3A** muestra los resultados de una citometría de flujo realizada sobre células de cáncer de ovario SKOV-3 y TOV-21G con el anticuerpo anti-KAAG1 3A4 (línea más oscura) en comparación con una IgG de control (línea más clara).

La **Figura 3B** muestra los resultados de una citometría de flujo realizada sobre células renales humanas 293E con el anticuerpo anti-KAAG1 3A4 (línea más oscura) en comparación con una IgG de control (línea más clara).

La **Figura 4** representa la detección del antígeno KAAG1 sobre la superficie de células SKOV-3 mediante citometría de flujo con el anticuerpo anti-KAAG1 3A4. La señal de fluorescencia se redujo con el tiempo cuando las células se incubaron a 37 °C, lo cual sugiere que el complejo de KAAG1/anticuerpo se interiorizó durante la incubación cuando las células se incubaron con 3A4.

La **Figura 5** muestra la interiorización del anticuerpo anti-KAAG1 3A4 y su colocalización con LAMP1, una proteína asociada con las membranas de lisosomas y endosomas.

Las **Figuras 6A y 6B** son gráficas que representan el análisis de FAC de células tumorales expuestas a diferentes anticuerpos anti-KAAG1.

La **Figura 7** son esquemas que presentan 2 representaciones probables de la orientación de KAAG1 en la membrana celular.

La **Figura 8** es un modelo molecular (diagrama en cinta) del dominio variable de 3A4 de murinos. Los bucles de

las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris.

La **Figura 9a** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh1Hh1 (es decir, la cadena ligera humanizada 1 y la cadena pesada humanizada 1) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh1 representa la cadena ligera humanizada de la variante 1 y Hh1 representa la cadena pesada de la variante 1.

La **Figura 9b** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh1Hh2 (es decir, la cadena ligera humanizada 1 y la cadena pesada humanizada 2) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh1 representa la cadena ligera humanizada de la variante 1 y Hh2 representa la cadena pesada de la variante 2.

La **Figura 9c** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh1Hh3 (es decir, la cadena ligera humanizada 1 y la cadena pesada humanizada 3) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh1 representa la cadena ligera humanizada de la variante 1 y Hh3 representa la cadena pesada de la variante 3.

La **Figura 9d** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh1Hh4 (es decir, la cadena ligera humanizada 1 y la cadena pesada humanizada 4) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh1 representa la cadena ligera humanizada de la variante 1 y Hh4 representa la cadena pesada de la variante 4.

La **Figura 9e** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh2Hh1 (es decir, la cadena ligera humanizada 2 y la cadena pesada humanizada 1) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh2 representa la cadena ligera humanizada de la variante 2 y Hh1 representa la cadena pesada de la variante 1.

La **Figura 9f** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh2Hh2 (es decir, la cadena ligera humanizada 2 y la cadena pesada humanizada 2) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh2 representa la cadena ligera humanizada de la variante 2 y Hh2 representa la cadena pesada de la variante 2.

La **Figura 9g** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh2Hh3 (es decir, la cadena ligera humanizada 2 y la cadena pesada humanizada 3) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh2 representa la cadena ligera humanizada de la variante 2 y Hh3 representa la cadena pesada de la variante 3.

La **Figura 9h** es un modelo molecular del anticuerpo humanizado Lh2Hh4 (es decir, la cadena ligera humanizada 2 y la cadena pesada humanizada 4) de los dominios variables de 3A4. Los bucles de las CDR se muestran en color negro y se marcan como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada. La región marco se muestra en color gris. Las cadenas laterales de los residuos mutados del marco murino al marco humano se presentan en una representación de bolas y barras. Lh2 representa la cadena ligera humanizada de la variante 2 y Hh4 representa la cadena pesada de la variante 4.

La **Figura 10a** es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de 3A4 de las cadenas ligeras humanizadas y de murino. La cadena ligera tiene dos variantes humanizadas (Lh1 y Lh2). Las CDR se muestran en negrita y se indican como CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Las retromutaciones en las regiones marco humanas que son aminoácidos de murino están subrayadas en las secuencias humanizadas.

La **Figure 10b** es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de 3A4 de las cadenas pesadas humanizadas y de murino. La cadena pesada tiene cuatro variantes humanizadas (de Hh1 a

Hh4). Las CDR se muestran en negrita y se indican como CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Las retromutaciones en las regiones marco humanas que son aminoácidos de murino están subrayadas en las secuencias humanizadas.

La **Figura 11A** es un alineamiento de la región variable de la cadena ligera de 3A4 de murino (SEQ ID NO.:4) con una variante de la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO.:33) utilizando el programa ClustalW2 (Larkin M.A., *et al.*, (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007 23(21): 2947-2948), donde un "*" (asterisco) indica posiciones que contienen un único residuo totalmente conservado, donde "." (dos puntos) indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares - puntuación > 0.5 en la matriz de Gonnet PAM 250 y donde "." (punto) indica la conservación entre grupos de propiedades poco similares - puntuación =< 0.5 en la matriz de Gonnet PAM 250.

La **Figura 11B** es un alineamiento de la región variable de la cadena pesada de 3A4 de murino (SEQ ID NO.:2) con una variante de la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO.:38) utilizando el programa ClustalW2 (Larkin M.A., *et al.*, (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007 23(21): 2947-2948), donde un "*" (asterisco) indica posiciones que contienen un único residuo totalmente conservado, donde "." (dos puntos) indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares - puntuación > 0.5 en la matriz de Gonnet PAM 250 y donde "." (punto) indica la conservación entre grupos de propiedades poco similares - puntuación =< 0.5 en la matriz de Gonnet PAM 250.

La **Figura 12a** representa un mapa del plásmido de pKCR5-3A4-HC-Variante 1. Las cadenas pesadas de las variantes humanizadas de 3A4 se clonaron del mismo modo en el sitio *Hind*III de pK-CR5. Como consecuencia, los plásmidos resultantes son idénticos a la variante 1 de pKCR5-3A4-HC, con la excepción de la secuencia del dominio variable de la inmunoglobulina de cadena pesada.

La **Figura 12b** representa un mapa del plásmido de pMPG-CR5-3A4-LC-Variante 1. Las cadenas ligeras de las variantes humanizadas 1 y 2 del anticuerpo 3A4 se clonaron del mismo modo en el sitio *Bam*HI de pMPG-CR5. Como consecuencia, el plásmido resultante es idéntico a pMPG-CR5-3A4-LC-Variante 1, con la excepción de la secuencia del dominio variable de la inmunoglobulina de cadena ligera.

La **Figura 13** 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 humanizado 3A4 se analizaron mediante inmunotransferencia de western. La cuantificación del anticuerpo producido en los sobrenadantes se determinó después de escanear las bandas de la inmunotransferencia de western frente a la dilución de un patrón conocido (anticuerpo IgG purificado humano). Mr: marcador de peso molecular (kDa).

La **Figura 14** es una gráfica de una filtración en gel Superdex G75 de una muestra de KAAG1 recombinante. Se inyectó KAAG1 para la filtración en gel y se separó a 0.4 ml/min. El pico más grande apareció entre las fracciones 15-19.

La **Figura 15** es una tabla que enumera las constantes de afinidad y velocidad para las variantes humanizadas y de murino del anticuerpo 3A4.

La **Figura 16A** es un histograma que ilustra las velocidades de asociación (K_a) de los anticuerpos humanizados.

La **Figura 16B** es un histograma que ilustra las velocidades de disociación (K_d) de los anticuerpos humanizados.

La **Figura 16C** es un histograma que ilustra las constantes de afinidad (K_D) de los anticuerpos humanizados.

La **Figura 17a** ilustra las variantes humanizadas de 3A4 que se unen a KAAG1 en un ELISA. Esta figura muestra la unión comparativa de las variantes del anticuerpo humanizado 3A4 y el 3A4 de murino. Los perfiles de unión en función de la concentración de las cadenas pesadas humanizadas (Hh1, Hh2, Hh3 y Hh4) se acoplaron con la variante de la cadena ligera Lh1.

La **Figura 17b** ilustra las variantes humanizadas de 3A4 que se unen a KAAG1 en un ELISA. Esta figura muestra la unión comparativa de las variantes del anticuerpo humanizado 3A4 y el 3A4 de murino. Los perfiles de unión en función de la concentración de las cadenas pesadas humanizadas (Hh1, Hh2, Hh3 y Hh4) se acoplaron con la variante de la cadena ligera Lh2.

La **Figura 18** ilustra las variantes humanizadas de 3A4 que se unen a KAAG1 sobre la superficie de células cancerosas. Esta ilustración muestra la actividad de unión comparativa de los anticuerpos 3A4 humanizados y de murino sobre las células de cáncer de ovario SKOV-3 no permeabilizadas.

Descripción detallada de la invención

Expresión y actividad biológica de KAAG1 en células cancerosas

La presente invención se refiere al uso de anticuerpos que tienen como diana tumores que se encuentran en varios tipos de cáncer, en particular el cáncer de ovario. Con el fin de dirigir los anticuerpos a los tumores, se debe llevar a cabo la identificación de antígenos específicos del tumor que se expresen en la superficie celular de las células cancerosas. Existen varias tecnologías disponibles para identificar antígenos específicos de tumores y el método que se utilizó para identificar KAAG1 en tumores de ovario, una plataforma de descubrimiento innovadora denominada amplificación de ARNm basada en la transcripción substractiva (STAR, por sus siglas en inglés), se describe en la solicitud de patente publicada N.º PCT/CA2007/001134, publicada con el N.º WO/2007/147265 el 27 de diciembre de 2007.

El análisis de las colecciones de STAR para el cáncer de ovario proporcionó muchos genes que codifican proteínas de la superficie celular y secretadas. Uno de ellos, denominado AB-0447, contenía un marco de lectura abierto que codificaba un polipéptido de 84 aminoácidos, correspondiente a la SEQ ID NO.:29, el cual fue codificado por un ADNc de 885 pares de bases con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO.:28. Una búsqueda en las bases de datos de dominio público indicó que la secuencia de nucleótidos de AB-0447 era idéntica a la de un gen denominado KAAG1. El análisis bioinformático pronosticó una proteína unida a la membrana que presentaba su dominio funcional al compartimento extracelular. KAAG1 se clonó originariamente a partir de una colección de cáncer de riñón como un antígeno de superficie celular, resultado que confirma su localización en la membrana. Además, los estudios de la presente mostraron que la proteína se procesó en su extremo aminoterminal, resultado que es coherente con la escisión de un péptido señal funcional en o entre los aminoácidos 30 y 34. Además, la expresión transitoria del ADNc de longitud completa dio como resultado la detección de KAAG1 escindido en el medio de cultivo. Este último descubrimiento indicó que esta proteína unida a la membrana podría desprenderse de las células cuando se expresara en niveles elevados. Por el contrario, la expresión de un mutante de KAAG1 con el grupo amino truncado dio como resultado la retención intracelular de la proteína. En la actualidad no existe ningún informe publicado que clarifique su función y la sobreexpresión de KAAG1 en el cáncer de ovario, según se describe en esta invención, nunca se ha documentado previamente.

Por lo tanto, hemos investigado si KAAG1 podría utilizarse en la terapia y el diagnóstico basados en anticuerpos.

Se han establecido varios modelos basados en células de cáncer de ovario, tales como TOV-21G, TOV-112D, OV-90 y otros, y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Estas células son parte de una colección de líneas celulares humanas de cáncer de ovario de pacientes con tumores de ovario o fluido de ascitis. Estas líneas celulares han sido sometidas a un análisis en profundidad, que incluye patrones de expresión génica globales en micromatrices que los convierten en excelentes modelos basados en células para el cáncer de ovario humano. Las propiedades de crecimiento, los patrones de expresión génica y la respuesta a fármacos quimioterapéuticos indicaron que estas líneas celulares eran muy representativas del comportamiento del tumor de ovario *in vivo* (Benoit *et al.*, 2007). El análisis de RT-PCR del ARN total aislado de estas líneas celulares de cáncer de ovario indicó que el transcrito de KAAG1 se expresaba débilmente en las líneas celulares derivadas de tumores primarios. Por el contrario, las líneas celulares derivadas de fluido de ascitis contenían niveles elevados de expresión de KAAG1. La mayor expresión de KAAG1 en células del fluido de ascitis sugirió que el entorno de las células influye sobre la regulación del gen KAAG1. Las células de ascitis se asocian con una enfermedad avanzada y su patrón de expresión implica que los mayores niveles de KAAG1 están asociados con un crecimiento independiente de anclaje. De acuerdo con esta última sugerencia, se observó que la expresión de KAAG1 aumentaba significativamente en líneas celulares derivadas de tumores primarios cuando estas células se cultivaban como esferoides en cultivos 3D. Estos esferoides han sido caracterizados exhaustivamente y se ha demostrado que presentan muchas propiedades asociadas con los tumores *in vivo* (Cody *et al.*, 2008). Por lo tanto, se ha demostrado que la expresión de KAAG1 aumenta significativamente en modelos que imitan la evolución de tumores, en particular durante la evolución de un cáncer de ovario.

Tras la demostración de que la expresión de KAAG1 está regulada en células de cáncer de ovario, se examinó la función de este gen en el comportamiento de las células de cáncer de ovario en ensayos basados en células. Con este fin, se utilizó interferencia por ARN (ARNi) para suprimir la expresión del gen KAAG1 endógeno en las líneas celulares de cáncer de ovario y se observó que la expresión reducida de KAAG1 dio como resultado una reducción significativa de la migración de las células, según se determinó en un ensayo de movilidad celular estándar, que se ejemplificó mediante un ensayo de curación (o rasguño) de una herida. Este tipo de ensayo mide la velocidad a la cual las células rellenan un área desnuda en una monocapa confluyente. La expresión reducida de KAAG1 dio como resultado una reducción de la supervivencia de las líneas celulares de cáncer de ovario, según se midió utilizando un ensayo clonogénico, tal como un ensayo de supervivencia de la colonia. Los expertos en la técnica pueden utilizar otros métodos para evaluar la función de KAAG1 en el comportamiento de células cancerosas, en particular células de cáncer de ovario.

Basándose en la expresión de KAAG1 en una gran proporción de tumores de ovario, su expresión limitada en tejidos normales y una concordancia entre los niveles de expresión y el aumento de la neoplasia, así como también una posible función biológica de KAAG1 en el comportamiento de líneas celulares de cáncer de ovario, se seleccionó KAAG1 como diana terapéutica para el desarrollo de anticuerpos para la detección, prevención y tratamiento del cáncer de ovario. La expresión de KAAG1 en diferentes tipos de cáncer, distintos al cáncer de ovario, llevó a la Solicitante a evaluar también anticuerpos terapéuticos o diagnósticos para otras indicaciones de cáncer.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno de estos que actúan específicamente sobre la diana KAAG1 y que se pueden utilizar, por ejemplo, como un conjugado de anticuerpo-fármaco. Pueden usarse anticuerpo anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno de este que actúan específicamente sobre la diana KAAG1 de la invención, por ejemplo, como un conjugado de anticuerpo-fármaco.

Tales anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos de dominios y polipéptidos que contienen una región de unión al antígeno. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención son anticuerpos humanizados y fragmentos de unión al antígeno.

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

Los anticuerpos se aislaron inicialmente a partir de colecciones de Fab para determinar su especificidad frente al antígeno de interés.

Las regiones variables de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se describen en la presente se pueden fusionar con regiones constantes de una especie deseada, de este modo se permite el reconocimiento del anticuerpo por las 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 síntesis de una región constante en fase con una región variable se encuentra dentro de las competencias de un experto en la técnica y se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante. Por lo tanto, los anticuerpos que comprenden una región constante de un anticuerpo humano, así como también los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que comprenden aminoácidos marco de un anticuerpo humano, también se engloban en la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona, en una realización ilustrativa, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aislado que comprende una región variable de la cadena ligera que contiene:

- a. una secuencia de CDRL1 que comprende la SEQ ID NO.:8 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:8;
 - b. una secuencia de CDRL2 que comprende la SEQ ID NO.:9 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:9; y
 - c. una secuencia de CDRL3 que comprende la SEQ ID NO.:10 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:10;
- y
- una región variable de la cadena pesada que contiene:
- d. una secuencia de CDRH1 que comprende la SEQ ID NO.:5 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:5;
 - e. una secuencia de CDRH2 que comprende la SEQ ID NO.:6 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:6; y
 - f. una secuencia de CDRH3 que comprende la SEQ ID NO.:7 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:7;

en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende regiones de marco humano.

En la presente también se describe un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aislado que comprende una región variable de la cadena ligera que contiene:

- a. una secuencia de CDRL1 que comprende la SEQ ID NO.:8 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:8;
- b. una secuencia de CDRL2 que comprende la SEQ ID NO.:9 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:9; y
- c. una secuencia de CDRL3 que comprende la SEQ ID NO.:10 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:10.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aislado también puede comprender una región variable de la cadena pesada que contenga:

- a. una secuencia de CDRH1 que comprende la SEQ ID NO.:5 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:5;
- b. una secuencia de CDRH2 que comprende la SEQ ID NO.:6 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:6; o
- c. una secuencia de CDRH3 que comprende la SEQ ID NO.:7 o como la que se expone en la SEQ ID NO.:7.

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

En otra divulgación ilustrativa, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender cualquier CDR individual o una combinación de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la región variable de la cadena pesada. Más concretamente, se puede seleccionar la CDR3. 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 al antígeno puede comprender al menos dos CDR de una CDRL1, una CDRL2 o una CDRL3.

También de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3.

- 5 Además, de acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender:
- a. al menos dos CDR de una CDRL1, CDRL2 o CDRL3; y
 - b. al menos dos CDR de una CDRH1, CDRH2 o CDRH3.

10 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender más preferentemente una CDRL1, una CDRL2 y una CDRL3.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno también puede comprender más preferentemente una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3.

15 De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender una CDRH1, una CDRH2 o una CDRH3.

20 De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno también puede comprender una CDRH1, una CDRH2 y una CDRH3.

25 Cuando solo hay disponible una de las siguientes: la región variable de la cadena ligera o la región variable de la cadena pesada, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se puede reconstituir realizando un cribado de una colección 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).

30 En la presente divulgación también se engloban polipéptidos o anticuerpos que comprenden cadenas variables con al menos una sustitución conservativa de un aminoácido en al menos una de las CDR descritas en la presente (en comparación con la CDR original).

La presente divulgación también engloba polipéptidos o anticuerpos que comprenden cadenas variables con al menos una sustitución conservativa de un aminoácido en al menos dos de las CDR (en comparación con las CDR originales).

35 La presente divulgación también engloba polipéptidos o anticuerpos que comprenden cadenas variables con al menos una sustitución conservativa de un aminoácido en las 3 CDR (en comparación con las CDR originales).

40 La presente divulgación también engloba polipéptidos o anticuerpos que comprenden cadenas variables con al menos dos sustituciones conservativas de aminoácidos en al menos una de las CDR (en comparación con las CDR originales).

La presente divulgación también engloba polipéptidos o anticuerpos que comprenden cadenas variables con al menos dos sustituciones conservativas de aminoácidos en al menos dos de las CDR (en comparación con las CDR originales).

45 La presente divulgación también engloba polipéptidos o anticuerpos que comprenden cadenas variables con al menos dos sustituciones conservativas de aminoácidos en las 3 CDR (en comparación con las CDR originales).

50 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un polipéptido, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende (en una única cadena polipeptídica o en cadenas polipeptídicas diferentes) al menos una región determinante de la complementariedad de una región variable de la cadena ligera y al menos una región determinante de la complementariedad de una región variable de la cadena pesada de uno de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente.

55 La presente divulgación se refiere, en otro de sus aspectos, a anticuerpos anti-KAAG1 que pueden comprender (en una única cadena polipeptídica o en cadenas polipeptídicas diferentes) las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento.

Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno variantes

60 La presente invención también engloba variantes de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno variantes incluidos son aquellos que contienen una variación en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno variantes que se describen en la presente son aquellos que contienen al menos una CDR variante (dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR variantes o incluso doce CDR variantes), los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno variantes que se describen en la presente o de la invención incluyen aquellos que contienen una región variable de la cadena ligera variante, una región variable de la cadena pesada variante, una cadena ligera variante y/o una cadena pesada variante. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno variantes incluidos en la presente invención son aquellos que

presentan, por ejemplo, una afinidad de unión mejorada o similar en comparación con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno original.

5 El término "variante", tal como se utiliza en la presente, se aplica a cualquiera de las secuencias descritas en la presente e incluye, por ejemplo, una CDR variante (ya sea CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3), una región variable de la cadena ligera variante, una región variable de la cadena pesada variante, una cadena ligera variante, una cadena pesada variante, un anticuerpo variante, un fragmento de unión al antígeno variante y una variante de KAAG1.

10 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno variantes englobados en la presente invención son aquellos que pueden comprender una inserción, una delección o una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa). Estas variantes pueden presentar una eliminación de al menos un residuo aminoacídico en su secuencia de aminoácidos y una inserción en su lugar de un residuo diferente.

15 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención puede contener una región variable de la cadena ligera y/o una región variable de la cadena pesada de acuerdo con la invención y puede comprender además aminoácidos de una región constante tales como, por ejemplo, aminoácidos de una región constante de un anticuerpo humano.

20 En una realización ilustrativa, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención puede comprender, por ejemplo, una región constante de IgG1 humana.

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

25 Un sitio de interés para la mutagénesis de sustitución incluye las regiones hipervariables (CDR), pero también se contemplan modificaciones en la región marco o incluso la región constante. Las sustituciones conservativas se pueden llevar a cabo intercambiando un aminoácido (de una CDR, cadena variable, anticuerpo, etc.) de uno de los grupos que se enumeran más adelante (grupo 1 a 6) por otro aminoácido del mismo grupo.

30 Otras realizaciones ilustrativas de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1A con el título "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado una propiedad indeseada, se pueden introducir entonces cambios más sustanciales, que se denominan "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 1A, o como se describen adicionalmente más adelante cuando se hace referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se pueden someter a un cribado.

35 Existe constancia en la técnica de que se pueden generar variantes mediante mutagénesis de sustitución y conservar la actividad biológica de los polipéptidos de la presente invención. Estas variantes presentan una eliminación de al menos un residuo aminoacídico en la secuencia de aminoácidos y una inserción en su lugar de un residuo diferente. Por ejemplo, un sitio de interés para la mutagénesis de sustitución puede incluir un sitio en el que los residuos particulares obtenidos de varias especies sean idénticos. En la Tabla 1A se muestran ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservativas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio no deseado, se introducen entonces otro tipo de sustituciones, que se denominan "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 1A, o como se describen adicionalmente en la presente cuando se hace referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se someten a un cribado.

40 Las modificaciones sustanciales en cuanto a la función o identidad inmunológica se llevan a cabo seleccionando sustituciones que difieran de forma significativa en su efecto a la hora de mantener (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina; (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

55	(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: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu)
	(grupo 4)	básicos: asparagina (Asn), glutamina (Gln), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg)
	(grupo 5)	residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: glicina (Gly), prolina (Pro); y
	(grupo 6)	aromáticos: triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe)

60 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otro.

Tabla 1A. Sustitución de aminoácidos

Residuo original	Sustitución ilustrativa	Sustitución conservativa
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

5 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno variante puede presentar una identidad secuencial y/o similitud secuencial sustancial en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno original. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en el porcentaje de identidades (aminoácidos idénticos) y de sustitución conservativa.

10 En general, el grado de similitud e identidad entre cadenas variables se ha determinado en la presente utilizando el programa de secuencias 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) utilizando los parámetros por defecto, es decir, el programa blastp, la matriz BLOSUM62 (penalización por abrir huecos de 11 y penalización por extensión de huecos de 1; gapx dropoff de 50, esperanza de 10.0, tamaño de palabra de 3) y filtros activados.

15 Por consiguiente, el porcentaje de identidad será indicativo de los aminoácidos que son idénticos en comparación con el péptido original y que pueden ocupar una posición similar o idéntica.

20 El porcentaje de similitud será indicativo de los aminoácidos que son idénticos y de aquellos que han sido reemplazados con sustitución conservativa de aminoácidos en comparación con el péptido original en una posición similar o idéntica.

25 Por consiguiente, las variantes de la presente invención comprenden aquellas que pueden presentar una identidad secuencial de al menos un 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

30 Las realizaciones ilustrativas de variantes son aquellas que presentan una identidad secuencial de al menos un 81% con una secuencia descrita en la presente y una similitud secuencial de un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

35 Otras realizaciones ilustrativas de variantes son aquellas que presentan una identidad secuencial de al menos un 82% con una secuencia descrita en la presente y una similitud secuencial de un 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

40 Otras realizaciones ilustrativas de variantes son aquellas que presentan una identidad secuencial de al menos un 85% con una secuencia descrita en la presente y una similitud secuencial de un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

Otras realizaciones ilustrativas de variantes son aquellas que presentan una identidad secuencial de al menos un 90% con una secuencia descrita en la presente y una similitud secuencial de un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

Otras realizaciones ilustrativas de variantes son aquellas que presentan una identidad secuencial de al menos un 95% con una secuencia descrita en la presente y una similitud secuencial de un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

5 Otras realizaciones ilustrativas más de variantes son aquellas que presentan una identidad secuencial de al menos un 97% con una secuencia descrita en la presente y una similitud secuencial de un 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia original o una porción de una secuencia original.

10 A efectos de concisión, la solicitante proporciona en la presente una Tabla 1B que ilustra las realizaciones ilustrativas de variantes individuales englobadas en la presente invención y que comprende el % de identidad secuencial y el % de similitud secuencial especificados. Se debe interpretar que cada "X" define una variante determinada.

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

15 La presente divulgación engloba CDR, regiones variables de la cadena ligera, regiones variables de la cadena pesada, cadenas ligeras, cadenas pesadas, anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno que comprenden una identidad de al menos un 80% con la secuencia descrita en la presente.

20 Las realizaciones ilustrativas del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención son aquellas que comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia con una identidad de al menos un 70%, 75%, 80% con la SEQ ID NO.:4.

25 Esta región variable de la cadena ligera que se describe en la presente puede comprender una secuencia de CDRL1 con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO.:8, una secuencia de CDRL2 con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO.:9 y una secuencia de CDRL3 con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO.:10.

30 En una realización ilustrativa de la presente divulgación, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRL1 que puede presentar una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO.:8.

En otra realización ilustrativa de la presente divulgación, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRL1 que puede presentar una identidad de un 100% con la SEQ ID NO.:8.

35 En otra realización ilustrativa de la presente divulgación, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRL2 que presente una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO.:9.

En otra realización ilustrativa de la presente divulgación, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRL2 que puede presentar una identidad de un 100% con la SEQ ID NO.:9.

En otra realización ilustrativa de la presente divulgación, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRL3 que puede presentar una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO.:10.

5 En una realización ilustrativa de la presente divulgación adicional, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRL3 que puede presentar una identidad de un 100% con la SEQ ID NO.:10.

10 En una realización ilustrativa, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprenda una secuencia con una identidad de al menos un 70%, 75%, 80% con la SEQ ID NO.:2.

15 Estas regiones variables de la cadena pesada que se describen en la presente pueden comprender una secuencia de CDRH1 con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO.:5, una secuencia de CDRH2 con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO.:6 y una secuencia de CDRH3 con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO.:7.

20 En una realización ilustrativa de la presente divulgación, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRH1 que puede presentar una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO.:5.

En otra realización ilustrativa de la presente divulgación, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRH1 que puede presentar una identidad de un 100% con la SEQ ID NO.:5.

25 En otra realización ilustrativa de la presente divulgación más, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRH2 que puede presentar una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO.:6.

30 En una realización ilustrativa de la presente divulgación adicional, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRH2 que puede presentar una identidad de un 100% con la SEQ ID NO.:6.

35 En una realización ilustrativa de la presente divulgación adicional más, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRH3 que puede presentar una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO.:7.

40 En una realización ilustrativa de la presente divulgación adicional, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente puede comprender una secuencia de CDRH3 que puede presentar una identidad de un 100% con la SEQ ID NO.:7.

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

45 Las realizaciones ilustrativas de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno variante incluyen aquellos que contienen una región variable de la cadena ligera como la que se expone en la SEQ ID NO.:30:

SEQ ID NO.:30

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVS

50 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVIYCFQGSHTVPLTFGXGTXLEXK,

55 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:4. La sustitución del aminoácido puede ser, por ejemplo, un aminoácido que se encuentra en la posición correspondiente de un anticuerpo humano natural o un anticuerpo humano consenso. La sustitución del aminoácido puede ser, por ejemplo, conservativa.

Otra realización ilustrativa de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno variante incluye aquellos que contienen una región variable de la cadena ligera como la que se expone en la SEQ ID NO.:31:

60 SEQ ID NO.:31

DX_{a1}VMTQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSP
X_{a7}LLIHTVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{a8}GVYYCFQGSHVPLTF
GX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K,

donde X_{a1} puede ser un aminoácido hidrófobo;

donde X_{a2} puede ser A o P;

5 donde X_{a3} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;

donde X_{a4} puede ser L o P;

donde X_{a5} puede ser un aminoácido ácido;

donde X_{a6} puede ser Q o P;

donde X_{a7} puede ser un aminoácido básico;

10 donde X_{a8} puede ser un aminoácido hidrófobo;

donde X_{a9} puede ser A o Q;

donde X_{a10} puede ser un aminoácido básico; o

donde X_{a11} puede ser un aminoácido hidrófobo,

15 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:4.

Una realización ilustrativa adicional de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno variante incluye aquellos que contienen una región variable de la cadena ligera como la que se expone en la SEQ ID NO.:32:

20 SEQ ID NO.:32

DX_{A1}VMTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSP
X_{A7}LLIHTVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{A8}GVYYCFQGSHVPLTF
GX_{A9}GTX_{A10}LEX_{A11}K

25 donde X_{A1} puede ser V o I

donde X_{A2} puede ser A o P

donde X_{A3} puede ser S o T

donde X_{A4} puede ser L o P

donde X_{A5} puede ser D o E

30 donde X_{A6} puede ser Q o P

donde X_{A7} puede ser K o Q

donde X_{A8} puede ser L o V

donde X_{A9} puede ser A o Q

donde X_{A10} puede ser R o K, o

35 donde X_{A11} puede ser L o I,

donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:4.

40 De acuerdo con una realización, la variante del dominio variable de la cadena ligera puede tener una secuencia como la que se expone en la SEQ ID NO.:33 o 34:

SEQ ID NO.:33

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVS
45 NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

SEQ ID NO.:34

DVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVS
50 NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

Las realizaciones ilustrativas de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno variante incluyen aquellos que contienen una región variable de la cadena pesada como la que se expone en la SEQ ID NO.:35:

SEQ ID NO.:35

55

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPY
 NGDTNYNQKFKGXXXXTDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQ
 GTXVTVSS,

5 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:2. La sustitución del aminoácido puede ser, por ejemplo, un aminoácido que se encuentra en la posición correspondiente de un anticuerpo humano natural o un anticuerpo humano consenso. La sustitución del aminoácido puede ser, por ejemplo, conservativa.

10 Otra realización ilustrativa de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno variante incluye aquellos que contienen una región variable de la cadena pesada como la que se expone en la SEQ ID NO.:36:

SEQ ID NO.:36

QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b1}
 0LEWX_{b11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b2}
 0SLX_{b21}SEDX_{b22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{b23}VTVSS,

15 donde X_{b1} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b2} puede ser P o A;
 donde X_{b3} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b4} puede ser V o K;
 20 donde X_{b5} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b6} puede ser un aminoácido básico;
 donde X_{b7} puede ser S o A;
 donde X_{b8} puede ser H o P;
 donde X_{b9} puede ser un aminoácido básico;
 25 donde X_{b10} puede ser S o G;
 donde X_{b11} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b12} puede ser un aminoácido básico;
 donde X_{b13} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b14} puede ser I o T;
 30 donde X_{b15} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b16} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b17} puede ser K o T;
 donde X_{b18} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;
 donde X_{b19} puede ser Q o E;
 35 donde X_{b20} puede ser N o S;
 donde X_{b21} puede ser T o R;
 donde X_{b22} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro; o
 donde X_{b23} puede ser S o L;
 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:2.

40 Una realización ilustrativa adicional de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno variante incluye aquellos que contienen una región variable de la cadena pesada como la que se expone en la SEQ ID NO.:37:
 45 SEQ ID NO.:37

QX_{B1}QLVQSGX_{B2}EX_{B3}X_{B4}KPGASVKX_{B5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{B6}QX_{B7}X_{B8}GX_{B9}X
 B10LEWX_{B11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{B12}X_{B13}X_{B14}X_{B15}TX_{B16}DX_{B17}SX_{B18}STAYMX_{B19}
 LX_{B20}SLX_{B21}SEDX_{B22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{B23}VTVSS

50 donde X_{B1} puede ser I o V;
 donde X_{B2} puede ser P o A;
 donde X_{B3} puede ser M o V;
 donde X_{B4} puede ser V o K;
 donde X_{B5} puede ser M o V;
 donde X_{B6} puede ser K o R;
 55 donde X_{B7} puede ser S o A;
 donde X_{B8} puede ser H o P;

5 donde X_{B9} puede ser K o Q;
 donde X_{B10} puede ser S o G;
 donde X_{B11} puede ser I o M;
 donde X_{B12} puede ser K o R;
 donde X_{B13} puede ser A o V;
 donde X_{B14} puede ser I o T;
 donde X_{B15} puede ser L o I;
 donde X_{B16} puede ser V o A;
 donde X_{B17} puede ser K o T;
 10 donde X_{B18} puede ser S o T;
 donde X_{B19} puede ser Q o E;
 donde X_{B20} puede ser N o S;
 donde X_{B21} puede ser T o R;
 donde X_{B22} puede ser S o T; o
 15 donde X_{B23} es S o L,
 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:2.

20 De acuerdo con una realización, la variante del dominio variable de la cadena pesada puede tener una secuencia como la que se expone en cualquiera de las SEQ ID NO.:38 a 41:

SEQ ID NO.:38

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPY
 NGDTNYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQG
 TLVTVSS.

SEQ ID NO.:39

30 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPY
 NGDTNYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQG
 TLVTVSS.

SEQ ID NO.:40

35 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYN
 GDTNYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQG
 TLVTVSS.

SEQ ID NO.:41

40 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYN
 GDTNYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGT
 LTVTVSS.

Producción de los anticuerpos en células

40 Los anticuerpos anti-KAAG1 que se describen en la presente se pueden preparar mediante varios métodos con los cuales estarán familiarizados los expertos en la técnica tales como la metodología de hibridomas o mediante métodos de ADN recombinante.

45 En una realización ilustrativa de la invención, se puede producir un anticuerpo anti-KAAG1 mediante la tecnología convencional de hibridomas, donde se inmuniza a un ratón con un antígeno, se aíslan las células del bazo y se fusionan con células de mieloma que carecen de expresión para HGPRT y células híbridas seleccionadas por medios que contengan hipoxantina, aminopterina y timina (HAT).

50 En una realización ilustrativa adicional de la invención, los anticuerpos anti-KAAG1 se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante.

Con el fin de expresar los anticuerpos anti-KAAG1, las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente o cualquier otra se pueden insertar en un vector de expresión, es decir, un vector que contenga elementos para el control de la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada en un huésped particular. Estos elementos pueden incluir secuencias reguladoras, tales como potenciadores, promotores constitutivos e inducibles, y regiones no traducidas 5' y 3'. Para construir tales vectores de expresión, se pueden utilizar métodos con los cuales estarán familiarizados los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

Se pueden utilizar varios sistemas de vector de expresión/célula huésped conocidos por los expertos en la técnica para expresar un polipéptido o ARN derivado de secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente. Estos incluyen, sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN que sean cósmidos, plásmidos o bacteriófagos recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de baculovirus; sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión víricos o bacterianos; o sistemas de células animales. Para la producción a largo plazo de proteínas recombinantes en sistemas mamíferos, se puede llevar a cabo la expresión estable en líneas celulares. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente se pueden transformar en líneas celulares utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes víricos de replicación y/o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable o visible en el mismo vector o en un vector diferente. La invención no está limitada por el vector o la célula huésped utilizada. En ciertas realizaciones de la presente invención, las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada de un anticuerpo de la invención pueden estar ligadas, cada una de ellas, a un vector de expresión diferente y cada cadena se puede expresar de forma separada. En otra realización, tanto la cadena ligera como la cadena pesada capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada de un anticuerpo de la invención pueden estar ligadas a un único vector de expresión y expresarse de forma simultánea.

Como alternativa, el ARN y/o polipéptido se puede expresar a partir de un vector que comprenda secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente utilizando un sistema de transcripción *in vitro* o un sistema acoplado de transcripción/traducción *in vitro*, respectivamente.

En general, las células huésped que contienen secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente y/o que expresan un polipéptido codificado por las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente, o una de sus porciones, se pueden identificar mediante varios procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, sin carácter limitante, hibridaciones de ADN/ADN o ADN/ARN, amplificación de PCR y bioensayo de proteínas o técnicas de inmunoensayos que incluyan tecnologías basadas en membranas, soluciones o chips para la detección y/o cuantificación de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Los métodos inmunológicos para detectar y medir la expresión de polipéptidos utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos son conocidos en la técnica. Los ejemplos de estas técnicas incluyen los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) y la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Los expertos en la técnica podrán adaptar fácilmente estas metodologías a la presente invención.

Por lo tanto, las células huésped que comprenden las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente se pueden cultivar en condiciones adecuadas para la transcripción del ARN correspondiente (ARNm, etc.) y/o la expresión del polipéptido a partir del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula puede ser secretado o retenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizado. En una realización ilustrativa, los vectores de expresión que contienen las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada de un anticuerpo de la invención se pueden diseñar para que contengan secuencias señal que dirijan la secreción del polipéptido a través de la membrana de una célula eucariota o procariota.

Debido a la degeneración inherente del código genético, se pueden producir y utilizar otras secuencias de ADN que codifiquen una secuencia de aminoácidos igual, sustancialmente igual o funcionalmente equivalente, por ejemplo, para expresar un polipéptido codificado por las secuencias de nucleótidos capaces de codificar una cualquiera de las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada que se describen en la presente. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención se pueden modificar utilizando métodos de uso común en la técnica para alterar las secuencias de nucleótidos con varios fines, que incluyen, sin carácter limitante, la modificación de la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto génico. Para modificar las secuencias de nucleótidos, se puede utilizar la transposición de secuencias de ADN mediante fragmentación aleatoria y reacomplamiento por PCR de fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida a un sitio y mediada por oligonucleótidos se puede utilizar para introducir mutaciones que creen sitios de restricción nuevos, alteren los patrones de glicosilación, modifiquen la preferencia de los codones, produzcan variantes de empalme, etc.

Además, se puede seleccionar una cepa de células huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el polipéptido expresado del modo deseado. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, sin carácter limitante, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.

En una realización ilustrativa, se pueden deseear anticuerpos anti-KAAG1 que contengan patrones o estructuras de glicosilación particulares. También se puede utilizar un procesamiento tras la traducción que escinda una forma "prepro" del polipéptido para especificar la diana, el plegamiento y/o la actividad de la proteína. Existen diferentes células huésped que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades tras la traducción (p. ej., CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138) que se pueden adquirir de proveedores comerciales y de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) y se pueden seleccionar para garantizar la correcta modificación y procesamiento del polipéptido expresado.

Los expertos en la técnica se darán cuenta fácilmente de que las secuencias de ácidos nucleicos naturales, modificadas o recombinantes se pueden ligar a una secuencia heteróloga para dar como resultado la traducción de un polipéptido de fusión que contenga restos polipeptídicos heterólogos en cualquiera de los sistemas huéspedes mencionados anteriormente. Tales restos polipeptídicos heterólogos pueden facilitar la purificación de los polipéptidos de fusión utilizando matrices de afinidad que se pueden adquirir de proveedores comerciales. Tales restos incluyen, sin carácter limitante, glutationa-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa, tiorredoxina, péptido de unión a calmodulina, 6-His (His), FLAG, c-myc, hemaglutinina (HA) y epítomos de anticuerpos tales como epítomos de anticuerpos monoclonales.

También se describe un polinucleótido que puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender una pareja de fusión (p. ej., HA, Fc, etc.) fusionada con el polipéptido (p. ej., cadena ligera completa, cadena pesada completa, regiones variables, CDR, etc.) que se describe en la presente.

Los expertos en la técnica también se darán cuenta fácilmente de que las secuencias de polipéptidos y ácidos nucleicos se pueden sintetizar, en parte o en su totalidad, utilizando métodos químicos o enzimáticos de uso común en la técnica. Por ejemplo, la síntesis de péptidos se puede llevar a cabo utilizando varias técnicas y máquinas en fase sólida, por ejemplo, el sintetizador de péptidos ABI 431A (PE Biosystems) se puede utilizar para automatizar la síntesis. Si se desea, la secuencia de aminoácidos se puede alterar durante la síntesis y/o combinar con secuencias de otras proteínas para producir una proteína variante.

Conjugados de anticuerpos

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención se puede conjugar con un resto detectable (es decir, a efectos de detección o diagnóstico) o con un resto terapéutico (a efectos terapéuticos).

Un "resto detectable" es un resto que se puede detectar por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos y/u otros medios físicos. El resto detectable se puede acoplar ya sea directa y/o indirectamente (por ejemplo, mediante un conector tal como, sin carácter limitante, un conector de tipo DOTA o NHS) a los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno de la presente invención utilizando métodos de uso común en la técnica. Se puede utilizar una amplia variedad de restos detectables y la selección dependerá de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación, los requisitos de estabilidad y la instrumentación disponible. Un resto detectable adecuado incluye, sin carácter limitante, una marca fluorescente, una marca radioactiva (por ejemplo, sin carácter limitante, ^{125}I , In^{111} , Tc^{99} , I^{131} e incluidos los isótopos de emisión de positrones para el escáner de tipo PET, etc.), una marca activa en resonancia magnética nuclear, una marca luminiscente, una marca quimioluminiscente, una marca cromófora, una marca enzimática (por ejemplo, sin carácter limitante, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), puntos cuánticos y/o una nanopartícula. El resto detectable puede provocar y/o producir una señal detectable y de este modo se puede detectar una señal procedente del resto detectable.

En otra realización ilustrativa de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se puede acoplar (modificar) con un resto terapéutico (p. ej., un fármaco, resto citotóxico, agente contra el cáncer).

En una realización ilustrativa, los anticuerpos anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender un agente quimioterapéutico, citotóxico o un fármaco contra el cáncer (p. ej., una molécula de bajo peso molecular). Tales agentes quimioterapéuticos o citotóxicos incluyen, sin carácter limitante, itrio-90, escandio-47, renio-186, yodo-131, yodo-125 y muchos otros conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., lutenio (p. ej., Lu^{177}), bismuto (p. ej., Bi^{213}), cobre (p. ej., Cu^{67})). En otros casos, el agente quimioterapéutico, citotóxico o fármaco contra el cáncer puede comprender, entre otros conocidos por los expertos en la técnica, 5-fluorouracilo, adriamicina, irinotecán, taxanos, endotoxinas de pseudomonas, ricina, auristatinas (p. ej., auristatina monometílica E, auristatina monometílica F), maitansinoides (p. ej., mertansina) y otras toxinas.

Como alternativa, con el fin de llevar a cabo los métodos de la presente invención y según es sabido en la técnica, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención (conjugado o no) se puede utilizar combinado con una segunda molécula (p. ej., un anticuerpo secundario, etc.) que sea capaz de unirse específicamente al

anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención y que puede contener un resto detectable, diagnóstico o terapéutico deseable.

Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos y su uso

Las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos anti-KAAG1 o fragmentos de unión al antígeno de la invención (conjugados o no) también se engloban en la presente invención. La composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo anti-KAAG1 o un fragmento de unión al antígeno y también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos de la invención se refieren a una composición que puede comprender el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención y un portador.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que puede comprender el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Además de los principios activos, una composición farmacéutica puede contener portadores farmacéuticamente aceptables que comprenden agua, PBS, soluciones salinas, gelatinas, aceites, alcoholes y otros excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos para obtener preparados que se puedan utilizar farmacéuticamente. En otros casos, tales preparados se pueden esterilizar.

La expresión "composición farmacéutica", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cantidades terapéuticamente eficaces del agente junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Una "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente, se refiere a aquella cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y un régimen de administración determinados. Tales composiciones son líquidas o formulaciones liofilizadas o secadas de otro modo e incluyen diluyentes con diferentes contenidos de tampones (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción a las superficies, detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), agentes solubilizantes (p. ej., glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabenos), agentes volumétricos o modificadores de la tonicidad (p. ej., lactosa, manitol), unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol a la proteína, complejación con iones metálicos o incorporación del material en o sobre preparados particulados de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, eritrocitos fantasma o esferoplastos. Tales composiciones influirán sobre el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen una formulación en soportes lipófilos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). También se engloban en la invención composiciones particuladas recubiertas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan recubrimientos protectores de formas particuladas, inhibidores de proteasas o potenciadores de la permeación para varias vías de administración, que incluyen la vía parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal y rectal. En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, paracanceral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

Además, las expresiones "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéutico", tal como se utilizan en la presente, son conocidas en la técnica e incluyen, sin carácter limitante, tampón de fosfato 0.01-0.1 M o 0.05 M o solución salina al 0.8%. De forma adicional, tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Algunos 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 portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas/de alcoholes, incluidos los medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, cloruro sódico y dextrosa, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de nutrientes y fluidos, reponedores de electrolitos tales como los basados en la dextrosa de Ringer y similares. También puede haber conservantes y otros aditivos presentes tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes adherentes, gases inertes y similares.

Para cualquier compuesto, se puede estimar inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz en ensayos de cultivos celulares o en modelos con animales tales como ratones, ratas, conejos, perros o cerdos.

También se puede utilizar un modelo con animales para determinar el intervalo de concentraciones y la vía de administración. A continuación, esta información se puede utilizar para determinar las dosis y vías de administración útiles en seres humanos. Estas técnicas son de uso común para los expertos en la técnica y una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de principio activo que mejora los síntomas o una afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o con animales de experimentación, por ejemplo, calculando y contrastando las estadísticas de DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50% de la población) y DL₅₀ (la dosis letal para un 50% de la población).

Cualquiera de las composiciones terapéuticas descritas anteriormente se puede aplicar a cualquier sujeto que necesite tal terapia, incluidos, sin carácter limitante, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, primates y seres humanos.

5 Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención se pueden administrar mediante un número cualquiera de vías, que incluyen, sin carácter limitante, la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal.

10 El término "tratamiento", a los efectos de esta descripción, se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objetivo es ralentizar (atenuar) la afección o trastorno patológico diana. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como también aquellos propensos a padecer el trastorno o aquellos en los que se ha de prevenir el trastorno. En particular, los sujetos que lo necesitan incluyen sujetos con un nivel elevado de uno o más marcadores del cáncer.

15 Los anticuerpos anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno de estos pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento de varios tipos de cáncer, tales como el cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma, etc. En una realización ilustrativa, los anticuerpos y fragmentos tienen usos terapéuticos en el cáncer de ovario. En una realización más particular, el sujeto puede padecer, por ejemplo, un cáncer de ovario recurrente. En otra realización más, el sujeto puede padecer, por ejemplo, un cáncer metastásico.

20 En ciertos casos, los anticuerpos anti-KAAG1 y los fragmentos pueden bloquear la interacción de KAAG1 con las proteínas a las que se acoplan. Los anticuerpos anti-KAAG1 de la presente invención se pueden utilizar en particular para suministrar un resto terapéutico a una célula que exprese KAAG1.

25 Los anticuerpos anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno de estos pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento de varios tipos de cáncer de ovario. Varios tipos de células diferentes pueden dar lugar a diferentes histotipos de cáncer de ovario. La forma más habitual de cáncer de ovario comprende tumores que se originan en la capa de células epiteliales del ovario o las trompas de Falopio. Tales tipos de cáncer de ovario epitelial incluyen tumores serosos, tumores endometrioides, tumores mucinosos, tumores de células claras y tumores frontera. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno de estos pueden tener usos en el
30 tratamiento de otros tipos de cáncer de ovario tales como el cáncer de ovario de los cordones sexuales y las líneas germinales.

35 En ciertos casos, los anticuerpos anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno de estos se pueden administrar de forma concurrente combinados con otros tratamientos administrados para la misma afección. En este sentido, los anticuerpos se pueden administrar con antimetabólicos (p. ej., taxanos), agentes basados en platino (p. ej., cisplatino), agentes que dañan el ADN (p. ej., doxorubicina) y otras terapias contra el cáncer conocidas por los expertos en la técnica. En otros casos, los anticuerpos anti-KAAG1 y fragmentos de unión al antígeno de estos se pueden administrar con otros anticuerpos terapéuticos. Estos incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos que tienen como diana EGFR, CD-20 y Her2.
40

La presente divulgación se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa KAAG1, donde el método puede comprender poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se describe en la presente.
45

La presente divulgación también engloba un método para tratar el cáncer o inhibir el crecimiento de células que expresan KAAG1 en un mamífero, donde el método puede comprender administrar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, por ejemplo, conjugado con un resto terapéutico descrito en la presente a un sujeto que lo necesite.

50 En otros aspectos, la presente invención proporciona usos terapéuticos, métodos de diagnóstico y un método de detección que utilizan el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención y el uso de estos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno en la elaboración de una composición farmacéutica o un fármaco para estos fines.

55 Por consiguiente, la invención se refiere al uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aislado que se describe en la presente en (la elaboración de una composición farmacéutica para) el tratamiento del cáncer.

Más concretamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede ser aplicable para tumores malignos que incluyen, por ejemplo, un tumor maligno con la capacidad de desarrollar metástasis y/o células tumorales caracterizadas por un crecimiento independiente de anclaje.
60

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención también se puede utilizar en el diagnóstico del cáncer. El diagnóstico del cáncer se puede llevar a cabo *in vivo* administrando el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención a un mamífero que padezca un cáncer o que se sospeche que padece un cáncer.
65 El diagnóstico también se puede llevar a cabo *ex vivo* poniendo en contacto una muestra obtenida a partir del mamífero con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y determinando la presencia o ausencia de células (células

tumorales) que expresen KAAG1 o una variante de KAAG1.

Por consiguiente, la presente divulgación también engloba un método para detectar el cáncer o detectar células que expresen KAAG1 en un mamífero, donde el método puede comprender administrar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se describe en la presente a un sujeto que lo necesite.

La presente invención se refiere, en otro de sus aspectos, a un uso para detectar una célula que exprese KAAG1 o una variante de KAAG1, donde el uso puede comprender poner en contacto la célula con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención y detectar un complejo formado por el anticuerpo y la célula que expresa KAAG1 o la variante de KAAG1. Las realizaciones ilustrativas de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno utilizados en los usos de detección son aquellos que son capaces de unirse a la región extracelular de KAAG1.

Otras realizaciones ilustrativas de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno utilizados en los métodos de detección son aquellos que se unen a KAAG1 o una variante de KAAG1 que se expresa en la superficie de una célula tumoral.

Los sujetos que los necesiten y que se beneficiarían de los métodos de tratamiento, detección o diagnóstico descritos en la presente son aquellos que padecen un cáncer o que se sospecha que padecen un cáncer, p. ej., cáncer de ovario (p. ej., seroso, endometroide, de células claras o mucinoso), cáncer de piel (p. ej., melanomas, carcinomas de células escamosas), cáncer renal (p. ej., carcinomas de células papilares, carcinomas de células claras), cáncer colorrectal (p. ej., carcinomas colorrectales), sarcoma, leucemia, tumor cerebral, tumor de tiroides, cáncer de mama (p. ej., carcinomas de mama), cáncer de próstata (p. ej., carcinomas prostáticos), tumor esofágico, tumor de vejiga, tumor de pulmón (p. ej., carcinomas de pulmón) o tumor de cabeza y cuello, y especialmente cuando el cáncer se caracteriza por ser maligno y/o cuando las células que expresan KAAG1 o una variante de KAAG1 se caracterizan por un crecimiento independiente de anclaje.

Los sujetos que padecen cáncer se pueden identificar mediante tomografía, biopsia tisular y pruebas genéticas. Como alternativa, los sujetos que padecen cáncer se pueden identificar mediante la presencia de marcadores del cáncer en sus fluidos corporales utilizando ensayos estándar (p. ej., ELISA y similares).

Están especialmente englobados en la presente invención los pacientes que padecen o que son propensos a padecer cáncer de ovario (p. ej., seroso, endometroide, de células claras o mucinoso), cáncer de piel (p. ej., melanomas, carcinomas de células escamosas) o cáncer renal (p. ej., carcinomas de células papilares) y especialmente cuando el cáncer se caracteriza por ser maligno y/o cuando las células que expresan KAAG1 o una variante de KAAG1 se caracterizan por un crecimiento independiente de anclaje.

Otra divulgación se refiere a un método para detectar KAAG1 (SEQ ID NO.:29), una variante de KAAG1 con una identidad secuencial de al menos un 80% con la SEQ ID NO.:29 o una forma secretada de una forma circulante de KAAG1 o la variante de KAAG1, donde el método puede comprender poner en contacto una célula que exprese KAAG1 o la variante de KAAG1 o una muestra (biopsia, suero, plasma, orina, etc.) que comprenda o que se sospeche que comprende KAAG1 o la variante de KAAG1 con el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno que se describen en la presente y medir la unión. La muestra puede proceder de un mamífero (p. ej., un ser humano), el cual puede padecer un cáncer (p. ej., cáncer de ovario, un cáncer metastásico) o se puede sospechar que padece un cáncer (p. ej., cáncer de ovario, un cáncer metastásico). La muestra puede ser una muestra tisular obtenida del mamífero o un sobrenadante de un cultivo celular.

De acuerdo con la invención, la muestra puede ser una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de sangre, semen o fluido de ascitis obtenido del mamífero. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se describe en la presente puede detectar de forma beneficiosa una forma secretada o circulante (que circule en la sangre) de KAAG1.

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

La unión de un anticuerpo a un antígeno provocará un incremento del peso molecular esperado del antígeno. Por consiguiente, tiene lugar un cambio físico cuando se produce la unión específica del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y el antígeno.

Estos cambios se pueden detectar utilizando, por ejemplo, electroforesis seguida de inmunotransferencia de Western y coloración del gel o la inmunotransferencia, espectrometría de masas, HPLC acoplada con una computadora, FACS u otros. Los aparatos capaces de detectar un cambio del peso molecular son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, Phosphorimager™.

Cuando el anticuerpo comprende, por ejemplo, una marca detectable, el complejo de anticuerpo-antígeno se puede detectar mediante la fluorescencia emitida por la marca, la emisión de radiación de la marca, la actividad enzimática de una marca proporcionada con su sustrato u otros.

La detección y/o medida de la unión entre un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y un antígeno se puede llevar a cabo mediante varios métodos conocidos en la técnica. La unión entre un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y un antígeno se puede monitorizar con un aparato capaz de detectar la señal emitida por la marca detectable (emisión de radiación, fluorescencia, cambio de color, etc.). Un aparato de este tipo proporciona datos que indican si la unión ha tenido lugar y también pueden indicar la cantidad de anticuerpo unido al antígeno. El aparato (normalmente acoplado a una computadora) también puede ser capaz de calcular la diferencia entre una señal de fondo (p. ej., una señal obtenida en ausencia de la unión de anticuerpo-antígeno) o ruido de fondo y la señal obtenida cuando tiene lugar la unión específica de anticuerpo-antígeno. De este modo, los aparatos de este tipo pueden proporcionar al usuario indicios y conclusiones sobre si el antígeno ha sido detectado o no.

Otros aspectos de la invención se refieren a kits que pueden incluir uno o más envases que contienen uno o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención.

15 Ácidos nucleicos, vectores y células

Los anticuerpos se preparan normalmente en células que permiten la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada expresadas a partir de uno o más vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o la cadena pesada.

Por consiguiente, la presente engloba ácidos nucleicos capaces de codificar cualquiera de las CDR, regiones variables de la cadena ligera, regiones variables de la cadena pesada, cadenas ligeras y cadenas pesadas que se describen en la presente.

25 Por consiguiente, la presente invención se refiere, en un aspecto adicional, a un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a KAAG1 de la invención.

Los ejemplos de los ácidos nucleicos de la presente divulgación incluyen ácidos nucleicos que codifican una región variable de la cadena ligera que comprende:

- a. una CDRL1 como la que se expone en la SEQ ID NO.:8 o que comprende la SEQ ID NO.:8;
- b. una CDRL2 como la que se expone en la SEQ ID NO.:9 o que comprende la SEQ ID NO.:9; o
- c. una secuencia de CDRL3 como la que se expone en la SEQ ID NO.:10 o que comprende la SEQ ID NO.:10.

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

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

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

- a. una secuencia de CDRH1 como la que se expone en la SEQ ID NO.:5 o que comprende la SEQ ID NO.:5;
- b. una secuencia de CDRH2 como la que se expone en la SEQ ID NO.:6 o que comprende la SEQ ID NO.:6; o
- c. una secuencia de CDRH3 como la que se expone en la SEQ ID NO.:7 o que comprende la SEQ ID NO.:7.

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

También se engloban en la presente divulgación ácidos nucleicos que codifican variantes de anticuerpos que tienen al menos una sustitución conservativa de un aminoácido.

De acuerdo con la presente divulgación, el ácido nucleico puede codificar una CDR que comprenda al menos una sustitución conservativa de un aminoácido.

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

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

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

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

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

10 Otras realizaciones se refieren a un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera con una identidad secuencial de al menos un 70%, 75%, 80% respecto a la SEQ ID NO.:4.

Otras realizaciones más se refieren a un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada con una identidad secuencial de al menos un 70%, 75%, 80% respecto a la SEQ ID NO.:2.

15 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un vector que comprende los ácidos nucleicos de la invención.

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

20 Los vectores que contienen los elementos para el control de la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada en un huésped particular son conocidos en la técnica. Estos elementos pueden incluir secuencias reguladoras, tales como potenciadores, promotores constitutivos e inducibles, y regiones no traducidas 5' y 3'. Para construir tales vectores de expresión, se pueden utilizar métodos con los cuales estarán familiarizados los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula aislada que puede comprender el ácido nucleico, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención.

30 La célula aislada puede comprender un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera y un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada ya sea en vectores diferentes 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 ya sea en vectores diferentes o en el mismo vector.

35 De acuerdo con la presente invención, la célula puede ser capaz de expresar, acoplar y/o secretar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula que puede comprender y/o puede expresar el anticuerpo descrito en la presente.

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

45 La célula puede ser capaz de expresar, acoplar y/o secretar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

Los ejemplos a continuación se presentan para exponer de forma adicional los detalles de la presente invención.

Ejemplos

50 **Ejemplo 1**

Este ejemplo describe la unión del anticuerpo 3A4 a KAAG1.

55 Los anticuerpos que se unen a KAAG1 se generaron utilizando la tecnología de presentación de fagos de Alere. En la Patente de los EE. UU. N.º 6.057.098 se puede encontrar una descripción detallada de la tecnología y los métodos para generar estos anticuerpos. Además, en el documento PCT/CA2009/001586 (publicado como WO2010/060186) se puede encontrar una descripción detallada de la generación de anticuerpos contra KAAG1. Resumiendo, la tecnología utiliza un cribado riguroso de colecciones de fagos que presentan los fragmentos de unión al antígeno (Fabs). Tras varias rondas de cribado, se obtuvo una colección, denominada Omniclonal, enriquecida en Fabs recombinantes que contenían regiones variables de la cadena ligera y pesada que se unían a KAAG1 con una afinidad y especificidad muy elevadas. A partir de esta colección, denominada más concretamente Omniclonal AL0003 A2ZB, se prepararon 96 Fabs monoclonales recombinantes individuales a partir de *E. coli* y se evaluaron para determinar su unión a KAAG1. El monoclonal denominado 3A4 se obtuvo a partir de esta placa de 96 pocillos de anticuerpos monoclonales basándose en su elevada actividad de unión para KAAG1 recombinante y su afinidad por KAAG1 en la superficie de células de cáncer de ovario.

Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera se muestran en las SEQ ID NOS.:1 y 3, respectivamente, y las secuencias polipeptídicas de las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera se muestran en las SEQ ID NOS.:2 y 4, respectivamente. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la inmunoglobulina de cadena pesada 3A4 se muestran en las SEQ ID NOS.:5, 6 y 7, respectivamente, y las CDR de la inmunoglobulina de cadena ligera 3A4 se muestran en las SEQ ID NOS.:8, 9 y 10, respectivamente.

Además de la posibilidad de realizar estudios de interacción entre los Fabs monoclonales y la proteína KAAG1, el uso de Fabs se ve limitado a la hora de realizar estudios *in vivo* e *in vitro* representativos 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 Fabs de 3A4 a matrices completas de anticuerpos para generar IgG1 quimérica humana-de ratón. Los vectores de expresión para las cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada se construyeron de modo que i) las secuencias peptídicas señal bacterianas originales situadas antes de los vectores de expresión de Fab se reemplazaron por péptidos señal de mamíferos y ii) las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada en los anticuerpos de ratón se reemplazaron con regiones constantes humanas. Los métodos para conseguir esta transferencia utilizaron técnicas estándar de biología molecular con las cuales estarán familiarizados los expertos en la técnica. En la presente se describe un resumen de la metodología.

Vector de expresión de la cadena ligera – un plásmido de expresión de mamífero existente, denominado pTTVH8G (Durocher *et al.*, 2002), diseñado para ser utilizado en el sistema de transfección transitorio 293E, se modificó para que incorporase la región variable de la cadena ligera de ratón. La cadena ligera quimérica humana-de ratón resultante contenía una región variable de ratón seguida de un dominio constante kappa humano. La secuencia de ADNc codificante del dominio constante kappa humano se amplificó mediante PCR con los cebadores OGS1773 y OGS1774 (SEQ ID NOS:11 y 12, respectivamente). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente para la región constante kappa humana se muestran en las SEQ ID NOS:13 y 14, respectivamente. El producto de PCR resultante con 321 pares de bases se ligó en pTTVH8G inmediatamente después de la secuencia peptídica señal de VEGF A humano (NM_003376). Este paso de clonación también posicionó sitios de restricción de endonucleasas únicos que permitieron el posicionamiento exacto de los ADNc codificantes de las regiones variables de la cadena ligera de ratón. La secuencia del plásmido de expresión final, denominado pTTVK1, se muestra en la SEQ ID NO.:15. Basándose en la secuencia variable de la cadena ligera de 3A4 que se muestra en la SEQ ID NO.:3, se diseñó un cebador de PCR específico para la región variable de la cadena ligera que incorporaba, en su extremo 5', una secuencia idéntica a los últimos 20 pares de bases del péptido señal de VEGF A. La secuencia de este cebador se muestra en la SEQ ID NO:16. Un cebador inverso (SEQ ID NO.:17) incorporó, en su extremo 3', una secuencia idéntica a los primeros 20 pares de bases del dominio constante kappa humano. Tanto los fragmentos de PCR como el pTTVK1 digerido se trataron con la actividad exonucleasa 3' – 5' de la ADN-polimerasa T4, lo cual dio como resultado extremos complementarios que se unieron por anelación. Las reacciones de anelación se transformaron en *E. coli* competente y los plásmidos de expresión se verificaron mediante secuenciación para garantizar que las regiones variables de la cadena ligera de ratón se habían insertado adecuadamente en el vector de expresión pTTVK1.

Vector de expresión de la cadena pesada – el vector de expresión que produjo la inmunoglobulina de cadena pesada 3A4 se diseñó de modo similar al pTTVK1 descrito anteriormente para la producción de inmunoglobulinas de cadena ligera. El plásmido pYD11 (Durocher *et al.*, 2002), que contenía la secuencia peptídica señal de IgG1 humana así como las regiones CH2 y CH3 del dominio Fc humano de IgG1, se modificó ligando la secuencia de ADNc codificante de la región CH1 constante humana. Los cebadores de PCR OGS1769 y OGS1770 (SEQ ID NOS:18 y 19), diseñados para que contuvieran sitios de restricción de endonucleasas únicos, se utilizaron para amplificar la región CH1 de IgG1 humana que contenía la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente que se muestran en las SEQ ID NOS:20 y 21. Tras ligar el fragmento con 309 pares de bases de CH1 humana inmediatamente después de la secuencia peptídica señal de IgGK, el plásmido modificado (SEQ ID NO.:22) se denominó pYD15. Cuando se liga una región variable de la cadena pesada seleccionada en este vector, el plásmido resultante codifica una inmunoglobulina de cadena pesada IgG1 completa con regiones constantes humanas. Los cebadores de PCR específicos para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 3A4 (SEQ ID NOS:1) se diseñaron para que incorporasen, en su extremo 5', una secuencia idéntica a los últimos 20 pares de bases del péptido señal de IgGK. La secuencia de estos cebadores se muestra en la SEQ ID NO:23. Un cebador inverso (SEQ ID NO.:24) incorporó, en su extremo 3', una secuencia idéntica a los primeros 20 pares de bases del dominio constante CH1 humano. Tanto los fragmentos de PCR como el pYD15 digerido se trataron con la actividad exonucleasa 3' – 5' de la ADN-polimerasa T4, lo cual dio como resultado extremos complementarios que se unieron por anelación. Las reacciones de anelación se transformaron en *E. coli* competente y los plásmidos de expresión se verificaron mediante secuenciación para garantizar que las regiones variables de la cadena pesada de ratón se habían insertado adecuadamente en el vector de expresión pYD15.

Expresión de IgG1 quimérica 3A4 humana 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 transitorio (Durocher *et al.*, 2002). Se optimizó la proporción de cadena ligera frente a pesada con el fin de conseguir el mayor rendimiento de anticuerpo en el medio de cultivo tisular y se determinó que era de 9:1 (L:H).

Unión de 3A4 quimérico a KAAG1 – Para medir la unión relativa del anticuerpo monoclonal 3A4, se produjo KAAG1

humano recombinante en células 293E utilizando la tecnología de transfección transitoria a gran escala (Durocher *et al.*, 2002; Durocher, 2004). La expresión y purificación de KAAG1 recombinante humano como una proteína de fusión Fc se describe en PCT/CA2009/001586 (publicado como documento WO2010/060186). Para llevar a cabo la unión de Fc-KAAG1 al preparado de anticuerpo, Fc-KAAG1 se biotiniló con NHS-biotina (Pierce, Rockford, IL) y se utilizaron 10 ng/pocillo como recubrimiento en una placa de 96 pocillos con estreptavidina durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió 3A4 quimérico purificado con concentraciones cada vez mayores y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo de cadena ligera anti-kappa humano conjugado con HRP en presencia de sustrato líquido TMB (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON) y se registraron las lecturas a 450 nm con un lector de placas de microvaloración. Según se muestra en la Figura 1, 3A4 interactuó con la proteína KAAG1 inmovilizada de un modo que dependía de la dosis. Cuando la IgG no relacionada de control se incubó con KAAG1 recombinante, no se observó ninguna actividad de unión, incluso para la concentración más elevada. Este resultado demostró que 3A4 se une a KAAG1 humano. La unión de 3A4 se comparó con la unión de 3D3 quimérico (descrito en Tremblay y Fillion (2009)), que presenta una especificidad de epítomos diferente (remítase al Ejemplo 2). La actividad de unión de 3A4 es muy similar a la de 3D3 en este tipo de ensayo (remítase a la Figura 1).

Ejemplo 2

Este ejemplo describe los estudios de mapeo de epítomos para determinar a qué región de KAAG1 se une el anticuerpo 3A4.

Para definir adicionalmente las regiones de KAAG1 que se unen al anticuerpo 3A4, se expresaron mutantes truncados de KAAG1 y se utilizaron en el ensayo de ELISA. En cuanto a KAAG1 de longitud completa, las versiones truncadas se amplificaron mediante PCR y se ligaron en pYD5 digerido con BamHI/HindIII. Los cebadores utilizados combinaron el oligonucleótido directo con la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO.:25 con cebadores de SEQ ID NOS:26 y 27, para producir fragmentos fusionados Fc que acababan en el aminoácido número 60 y 35 de KAAG1, respectivamente. La expresión de estos mutantes recombinantes se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente para Fc-KAAG1 de longitud completa y se purificaron con agarosa-proteína A.

Basándose en los estudios de Tremblay y Fillion (2009), existe constancia de que otros anticuerpos interactúan con regiones específicas de KAAG1 recombinante. De este modo, los anticuerpos anti-KAAG1 3C4, 3D3 y 3G10 interactúan con las regiones 1–35, 36–60 y 61–84 de KAAG1, respectivamente. Se reprodujeron estos resultados de unión y se muestran en la Figura 2. Con el fin de determinar la región de KAAG1 que se une al anticuerpo 3A4, se realizó un ensayo de ELISA utilizando las fusiones truncadas de Fc y KAAG1 de acuerdo con un protocolo similar al descrito en el Ejemplo 1. Las únicas modificaciones fueron el uso de diferentes mutantes truncados de Fc-KAAG1 biotinilados. Los resultados muestran que la especificidad de unión de 3A4 es similar a la de 3G10. En mutantes de KAAG1 que no contienen las secuencias de aminoácidos más allá del aminoácido 60, la unión de 3A4 a KAAG1 no tiene lugar. Esto indica que 3A4 interactúa con una región definida por los aminoácidos 61–84 de KAAG1 humano. La observación de que 3A4 y 3D3 tienen virtualmente una actividad de unión idéntica, según se determinó por ELISA (Ejemplo 1), pero tienen una especificidad de epítomos muy diferente sugiere que las propiedades de unión de 3A4 son bastante diferentes a las de 3D3.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la capacidad de 3A4 de unirse a KAAG1 en la superficie de líneas celulares cancerosas.

Se utilizó citometría de flujo para detectar KAAG1 en la superficie de líneas celulares. Basándose en los análisis de expresión de RT-PCR utilizando cebadores específicos de ARNm para KAAG1, cabía esperar que las líneas celulares cancerosas seleccionadas expresaran la proteína KAAG1. Para verificar esto, células de cáncer de ovario (SKOV-3 y TOV-21G) y una línea celular de control que presentaba muy poca expresión de KAAG1 (293E). Las células se cultivaron utilizando EDTA 5 mM, se contaron con un hemocitómetro y se volvieron a suspender en tampón de FCM (0.5% de BSA, 10 µg/ml de suero de cabra en 1x PBS) con una densidad celular de 2×10^6 células/ml. Se añadió 3A4 quimérico o una IgG de control a 100 µl de células con una concentración final de 5 µg/ml y se incubaron en hielo durante 2 h. Las células se lavaron con PBS frío para eliminar los anticuerpos no unidos, se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de FCM que contenía un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con FITC (dilución de 1:200) como anticuerpo secundario y se incubaron en hielo durante 45 min. Tras otro paso de lavado con PBS frío, las células se volvieron a suspender en 250 µl de tampón de FCM y se analizaron con un citómetro de flujo. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3A y 3B. La incubación de las líneas celulares con el anticuerpo de control dio como resultado histogramas que se correspondían con la señal obtenida habitualmente cuando se omitía el anticuerpo de las células. Esto estableció la señal de fondo para estos valores de FCM (Figuras 3A y 3B). Por el contrario, la incubación de SKOV-3 y TOV-21G con el anticuerpo quimérico 3A4 dio como resultado una fuerte señal de fluorescencia (Figuras 3A). Esto indicó que el anticuerpo detecta de forma eficaz KAAG1 en la superficie de estas células cancerosas. Cabía esperar que las células 293E, una línea de células de riñón humanas, mostraran muy poca expresión de KAAG1 y, efectivamente, el histograma de FCM no mostró casi ningún desplazamiento en comparación con el anticuerpo de control (remítase a la Figura 3B). Por consiguiente, 3A4 detectó de forma específica KAAG1 en la superficie de las células cancerosas. La actividad de 3A4 se comparó con la de 3D3, un anticuerpo anti-KAAG1

descrito en los estudios de Tremblay y Filion (2009). Basándose en esta solicitud de patente, existía constancia de que 3D3 podía detectar KAAG1 en la superficie de células cancerosas, según se determinó por FCM. Esto se confirmó cuando se incubó 3D3 en presencia de células SKOV-3 y TOV-21G (remítase a la Figura 3A). La señal de fluorescencia no fue tan elevada en comparación con la de 3A4, lo cual indica que 3A4 tiene una capacidad diferente y más elevada para detectar KAAG1 en la superficie de células de cáncer de ovario. Otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que 3A4 pudo detectar KAAG1 en la superficie de células cancerosas en condiciones en las que 3D3 no mostró ninguna actividad en este ensayo (no se muestran los resultados). Consideradas conjuntamente, estas observaciones y la diferencia en la especificidad de epítomos de 3A4 en comparación con 3D3 sugieren que estos anticuerpos poseen diferentes propiedades anti-KAAG1.

Ejemplo 4

Métodos para utilizar el anticuerpo anti-KAAG1 3A4 como un conjugado de anticuerpo

Según se ha demostrado anteriormente, el antígeno KAAG1 fue detectado por 3A4 en la superficie de células cancerosas utilizando citometría de flujo. Pueden tener lugar varios eventos moleculares diferentes cuando un anticuerpo se une a su diana en la superficie de las células. Estos incluyen i) el bloqueo de la accesibilidad para otro antígeno/receptor de la superficie celular o un ligando, ii) la formación de un complejo anticuerpo-antígeno relativamente estable para permitir que las células se conviertan en diana mediante ADCC o CDC, iii) pueden tener lugar eventos de señalización, por ejemplo, anticuerpos agonistas, iv) se puede interiorizar el complejo, o v) el complejo se puede desprender de la superficie celular. Para resolver esta cuestión, pretendemos examinar el comportamiento del complejo anticuerpo 3A4-KAAG1 en la superficie de las células. Se colocaron células SKOV-3 en placas, se lavaron y se incubaron con 5 µg/ml de anticuerpo quimérico 3A4 según se ha descrito en el Ejemplo 3. Después del lavado, se añadió medio de OSE completo y las células se trataron a 37 °C durante un máximo de 90 minutos. Las células se retiraron en los tiempos indicados (remítase a la Figura 4), se enfriaron rápidamente, se prepararon para citometría con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con FITC y los resultados se expresaron como el porcentaje de la intensidad de fluorescencia media (intensidad de fluorescencia media, %) remanente. Según se ilustra en la Figura 4, la señal de fluorescencia se reduce rápidamente durante un periodo de 30-45 minutos. Este resultado indica que el complejo 3A4/KAAG1 desapareció de las células, lo cual indica que probablemente tuvo lugar la interiorización del complejo. Los estudios preliminares para elucidar el mecanismo responsable de esta reducción de la fluorescencia en la superficie celular han puesto de manifiesto que al parecer el complejo ha sido interiorizado.

Estas conclusiones se confirmaron de forma adicional realizando inmunofluorescencia en células vivas para ver si esta interiorización se podía observar microscópicamente. Se sembraron células SKOV-3 en portaobjetos con medio completo (medio de OSE (Wisent) que contenía un 10% de FBS, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 1X aminoácidos no esenciales y antibióticos). Una vez que las células se adhirieron adecuadamente, se añadió medio fresco que contenía el anticuerpo quimérico anti-KAAG1 3A4 con una concentración de 10 µg/ml y se incubó a 37 °C durante 4 h. Las células se lavaron con PBS y a continuación se fijaron con paraformaldehído al 4% (en PBS) durante 20 min. Tras el lavado, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% en PBS durante 5 min. El bloqueo se llevó a cabo con leche en polvo al 1.5% en PBS durante 1 h. Se detectó la proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (LAMP1, Chang *et al.*, 2002) mediante la incubación con anti-LAMP1 (Santa Cruz, sc-18821, dilución de 1:100) en leche al 1.5% en PBS durante 2 h. Tras el lavado en PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios junto con leche al 1.5% y se incubaron durante 1 h. Para los anticuerpos quiméricos anti-KAAG1, el anticuerpo secundario era un anticuerpo anti-IgG humana (H+L) de burro conjugado con Rhodamine Red-X y con una dilución de 1:300. Para el anticuerpo anti-LAMP1, el anticuerpo secundario era un anticuerpo anti-IgG de ratón (H+L) producido en cabra conjugado con DyLight488 y con una dilución de 1:300. Ambos anticuerpos secundarios eran de Jackson ImmunoResearch. Los portaobjetos se lavaron con PBS y se montaron en reactivo ProLong Gold Antifade con DAPI. Según se observa en la Figura 5A, después de 4 horas de incubación a 37 °C en presencia de células de cáncer de ovario SKOV-3, se pudo detectar el anticuerpo 3A4 en complejos predominantemente cercanos al área perinuclear (*flechas*, remítase a la tinción roja en el panel izquierdo de la Figura 5A), lo cual es típico de las vías de interiorización basadas en endosomas-lisosomas. Esta observación se confirmó adicionalmente cuando se visualizó un marcador de lisosomas, LAMP1, y se observó que también se expresaba en estas áreas (*flechas*, remítase a la tinción verde en el panel central de la Figura 5A). Cabe destacar que la fusión de las dos imágenes dio como resultado la aparición de estructuras amarillas-naranjas que indicaban que los anticuerpos 3A4 y anti-LAMP1 estaban presentes en las mismas estructuras (*flechas*, remítase a la tinción amarilla en el panel derecho de la Figura 5A). La localización conjunta de 3A4, que se une a KAAG1 en la superficie de células cancerosas, con LAMP1, un marcador de endosomas/lisosomas tardíos, indica que el complejo anticuerpo/antígeno se interiorizó y que sigue una vía que permite la liberación de una carga útil que se conjugaría con el anticuerpo 3A4. Se observaron resultados idénticos en otra línea de células cancerosas, TOV-21G (remítase a la Figura 5B).

Considerados conjuntamente, estos estudios demuestran que los anticuerpos específicos para KAAG1, tales como 3A4, pueden tener aplicaciones como conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés). De este modo, el elevado nivel de especificidad por el cáncer de ovario de KAAG1, junto con la capacidad de esta diana de ser interiorizada en las células, están a favor del desarrollo de aplicaciones como ADC.

Ejemplo 5

Detección preferencial de KAAG1 en la superficie de células cancerosas

Aunque se han desarrollado varios anticuerpos que interactúan con diferentes epítomos de la proteína KAAG1, no se ha elucidado completamente la accesibilidad de estos epítomos cuando KAAG1 se expresa en la superficie de células cancerosas intactas. Los análisis bioinformáticos de la estructura primaria de los aminoácidos de KAAG1 (el número total de aminoácidos en la proteína humana es 84) no pusieron de manifiesto ninguna secuencia obvia que pudiera corresponder a un dominio transmembrana y, por consiguiente, no se pudo comprender completamente cómo KAAG1 se une a la membrana celular.

Se ha descubierto que los anticuerpos generados contra KAAG1 se unen a tres regiones diferentes de la proteína KAAG1 (remítase a PCT/CA2009/001586, publicado como WO2010/060186). La mayoría de los anticuerpos interactúan con los aminoácidos 35–60 de la proteína KAAG1, por ejemplo, los anticuerpos 3D3 y 3G12 de esta solicitud. Un ejemplo de anticuerpos que interactúan con el extremo carboxiterminal de KAAG1 entre los aminoácidos 61–84 es el anticuerpo 3A4. Finalmente, los anticuerpos que interactúan con la región aminoterminal de la proteína, por ejemplo, 3C4, presentaron una unión muy escasa a las células que expresan KAAG1.

Esta solicitud muestra que, cuando KAAG1 se expresa en las células, la región carboxiterminal (aminoácidos 61–84) está expuesta al espacio extracelular y que los anticuerpos que tienen como diana esta región son los más eficaces a la hora de detectar y potencialmente tratar células KAAG1-positivas. Los anticuerpos que se unen a la región central de KAAG1 (aminoácidos 35–60) también pueden detectar KAAG1 en la superficie celular, pero en menor grado que los anticuerpos que interactúan con el extremo carboxiterminal.

Las líneas celulares de cáncer de ovario, tales como SKOV-3, son positivas respecto a la expresión de KAAG1. Se utilizaron estas células para detectar la expresión de KAAG1 mediante citometría de flujo, que es un método que permite la detección de proteínas de la superficie celular y es de uso común para los expertos en la técnica. Resumiendo, se incubaron 100 000 células para cada muestra en hielo durante 1 h con el anticuerpo primario (anti-KAAG1 o el anticuerpo de control) con una concentración de 1 µg/ml. Tras varios lavados con PBS enfriado con hielo, las células teñidas se incubaron con el anticuerpo secundario que estaba conjugado con un fluorocromo (FITC), el cual detecta la presencia del anticuerpo primario unido a las células. Tras varios lavados adicionales, las células se analizaron con un citómetro de flujo. Los resultados expresados en la Figura 6 muestran el eje de las Y que representa el recuento (células) y el eje de las X que representa la cantidad de fluorescencia (señal de fluorescencia). Cuando las células SKOV-3 se incubaron con el anticuerpo 3A4, se observó un gran desplazamiento de la fluorescencia, lo cual indica que había una cantidad abundante de proteína KAAG1 en la superficie de las células (Figura 6A) y que era reconocida de forma eficaz por este anticuerpo. En unas condiciones idénticas, los anticuerpos que interactúan con la región central de KAAG1, 3G12 y 3D3 (Figura 6A), fueron significativamente menos eficaces a la hora de detectar KAAG1. Cuando las células se incubaron con una mayor concentración de 3G12 o 3D3, se pudo detectar KAAG1 en la superficie celular (no se muestra). Cuando las células se incubaron con IgG de control (Figura 6A) o 3C4, un anticuerpo contra el extremo aminoterminal de KAAG1 (Figura 6A), no se observó ninguna señal. Estos resultados indican que los anticuerpos que interactúan con el extremo carboxiterminal de KAAG1 pueden detectar el antígeno en la superficie de células cancerosas de forma más eficaz que los anticuerpos dirigidos contra otras regiones de KAAG1. Esto implica que el extremo carboxiterminal de KAAG1 está expuesto al espacio extracelular (fuera) de la célula. Se obtuvieron resultados similares para otras líneas de células cancerosas que expresan KAAG1.

El experimento también se llevó a cabo en células SKOV-3 que se permeabilizaron con Triton X-100. Normalmente, se utiliza Triton X-100 para permeabilizar membranas celulares y liberar proteínas de membrana. Cuando las células permeabilizadas se incubaron con 3A4 y se midieron en el citómetro de flujo (remítase a la Figura 6B), la señal fue similar a la obtenida en las células intactas. Sorprendentemente, cuando las células permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo 3G12 que se une a la región central de KAAG1 (Figura 6B), la señal fue tan intensa como la de 3A4. Estos resultados indican que probablemente la región central de KAAG1 está presente en la membrana celular o en el interior de la célula. Se obtuvo un resultado similar con el anticuerpo 3D3, otro anticuerpo que se une a la región central (Figura 6B), pero la señal obtenida para 3D3 no fue tan intensa. Al igual que antes, el control de IgG no mostró ninguna señal detectable en este ensayo (Figura 6B). Cabe destacar que la incubación de las células con el anticuerpo 3C4, el cual se une a la región amino de KAAG1, no dio como resultado ninguna señal detectable (Figura 6B). Este último resultado sugirió que probablemente la región amino de KAAG1 se escinde durante el transporte de la proteína hacia la membrana celular.

En conjunto, estos experimentos proporcionan mucha información sobre la estructura y orientación del antígeno KAAG1 cuando se expresa en la superficie de células cancerosas. Basándose en estos datos, se proponen dos modelos para la estructura de KAAG1 en la superficie celular (Figura 7). En el primer modelo (Figura 7, Modelo A), los datos sugieren que la porción central es de hecho la región transmembrana de KAAG1 que está expuesta solo parcialmente al espacio extracelular. Esto haría que el extremo carboxiterminal de KAAG1 se pudiera detectar fácilmente y que fuera más difícil unirse a la región central. En el segundo modelo (Figura 7, Modelo B), KAAG1 está unido a la membrana mediante otra proteína que, a su vez, está embebida en la membrana celular. De nuevo, los anticuerpos tales como 3A4 podrían acceder fácilmente al extremo carboxiterminal, pero la interacción entre KAAG1 y su pareja proteica dificultaría el acceso a la región central. Los resultados que muestran tanto los anticuerpos que

se unen al extremo carboxiterminal (por ejemplo, 3A4) como los que se unen a la región central (por ejemplo, 3G12 y 3D3) evaluados en presencia de células permeabilizadas concuerdan con ambos modelos. La incapacidad del anticuerpo 3C4 para unirse a KAAG1 en células permeabilizadas o intactas se debe probablemente a la falta de los aminoácidos contenidos en el extremo aminoterminal de la forma de membrana procesada madura de KAAG1 y ambos modelos concuerdan con esto.

Estos resultados implican que los anticuerpos que tienen como diana el extremo carboxiterminal de KAAG1 en células cancerosas, en particular la región comprendida entre los aminoácidos 61–84, son los más adecuados para el desarrollo de anticuerpos para usos como agentes terapéuticos para el tratamiento de carcinomas que expresan KAAG1. Además, otros usos para los anticuerpos contra KAAG1 que se unen a la región carboxiterminal incluyen reactivos de diagnóstico para la detección de carcinomas que expresan KAAG1.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen una especificidad de unión similar a la del anticuerpo 3A4 se pueden generar o aislar inmunizando a un animal con la porción C-terminal de KAAG1 de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, incluida la tecnología de hibridomas, realizando un cribado de una colección de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno con la porción C-terminal de KAAG1 y/o realizando ensayos de competición de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno aislados con el anticuerpo 3A4 descrito en la presente.

Ejemplo 6

Humanización mediante el diseño del anticuerpo monoclonal de ratón 3A4

Modelización 3D de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 3A4 de ratón

Esta tarea se llevó a cabo mediante modelización por homología. Las estructuras patrón más similares a las secuencias de las regiones variables de 3A4 de murino de las cadenas ligera y pesada (SEQ ID NOs: 4 y 2) se identificaron mediante una búsqueda en BLAST frente a PDB. Para construir un modelo inicial de la región variable de 3A4 de ratón, se utilizaron las siguientes estructuras patrón (códigos de PDB): 2IPU (cadena L) para la cadena ligera y 1F11 (cadena B) para la cadena pesada. Se pueden encontrar otros patrones adecuados en la entrada de PDB 2DDQ para la cadena ligera y en las entradas de PDB 3IY3, 1KTR, 2VXT, 1A6T y 1IGI para la cadena pesada. Se realizaron las mutaciones necesarias en estas estructuras patrón de acuerdo con las secuencias de 3A4 de murino: 7 mutaciones en la cadena ligera 2IPU y 17 mutaciones más una delección de 3 residuos en la cadena pesada 1F11. Las estructuras mutadas correspondientes a las cadenas ligera y pesada de las regiones variables de 3A4 de murino se acoplaron para obtener estructuras de anticuerpo de dos cadenas superponiendo las cadenas ligera y pesada de las estructuras patrón respectivas. La estructura resultante de la región variable de 3A4 acoplada se refinó en primer lugar por minimización de energía con el campo de fuerza AMBER y una liberación de tensiones por pasos, desde los bucles de CDR que se relajaron en primer lugar, hasta los átomos pesados del esqueleto de la región marco que se relajaron completamente solo en el último estadio. El bucle CDR-H3 en cada estructura de región variable del anticuerpo se refinó a continuación mediante un muestreo conformacional de minimización de Monte Carlo (MCM, por sus siglas en inglés), en el cual los ángulos dihédricos de la región CDR-H3 se muestrearon en cada ciclo de MCM y a continuación se realizó una minimización de la energía de una región predefinida que se extendía 10 Å alrededor de la conformación inicial del bucle CDR-H3. En la Figura 8 se muestra una representación de la región variable modelada del anticuerpo 3A4 de ratón. Las estructuras de las secuencias variables humanizadas o humanas más similares a cada una de las secuencias variables de 3A4 también se identificaron a partir de PDB y a continuación se superpusieron sobre las estructuras modeladas de las regiones variables de 3A4 de murino. Estas estructuras incluyen las entradas de PDB 3QCT, 3AAZ, 1WT5 y 3M8O para la cadena ligera, y las entradas de PDB 1I9R, 3NFP, 1T04, 1ZA6, 3HC4, 2D7T y 1WT5 para la cadena pesada. Estas estructuras se utilizaron para facilitar la modelización de las mutaciones en la región marco con el fin de construir estructuras 3D humanizadas a partir de la estructura 3D de murino modelada.

Caracterización de la estructura modelada y las secuencias de aminoácidos de 3A4 de ratón

Este paso se llevó a cabo para estimar el índice de humanidad, el índice de la tendencia al contacto con el antígeno, para definir las CDR, los residuos canónicos, el empaquetamiento entre cadenas (residuos de la interfase VH/VL), el empaquetamiento de la región variable/constante (residuos de las interfases VH/CH y VL/CL), residuos marco inusuales, posibles sitios de N- y O-glicosilación, residuos enterrados, residuos de la zona Vernier y la proximidad a las CDR. Para evaluar estas propiedades, se utilizaron software local y fuentes disponibles en Internet.

Selección de los mejores marcos humanos de la cadena pesada y la cadena ligera para las CDR de ratón

Esto se llevó a cabo mediante la comparación estándar de la homología de las secuencias frente a una copia local de bases de datos de líneas germinales humanas (VBASE), frente a otras colecciones de secuencias (Genbank y SwissProt), así como también el conjunto de secuencias consenso de marco humano. Se realizaron búsquedas en BLAST para obtener coincidencias de las secuencias con la homología más elevada en la región marco solamente (por lo tanto, excluyendo las CDR), a la vez que se hacía coincidir la longitud de los bucles de las CDR. Los marcos humanos identificados para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 3A4 se correspondieron con las clases k2 y h1, respectivamente. Se conservaron varias secuencias marco de líneas germinales humanas que eran las más

similares a las secuencias marco de 3A4, además de las secuencias consenso humanas para estas clases.

Identificación de residuos marco para retromutaciones y diseño de variantes humanizadas múltiples

5 Este es un paso importante que marca los residuos aminoacídicos que se deberían mutar para las correspondientes secuencias humanas con particular atención. Estos residuos representan candidatos principales para retromutaciones para las secuencias de ratón en caso de pérdida de afinidad. Es el paso más difícil e impredecible de la humanización por diseño, particularmente en ausencia de una estructura experimental del complejo anticuerpo-antígeno. Se basa en la identificación de residuos en una o más de las siguientes categorías: canónica, CDR-H3, zona de Vernier, inusual, próxima a CDR (dentro de una distancia de 5 Å), empaquetamiento entre cadenas y residuos de sitios de glicosilación. Estos residuos pueden afectar al sitio de unión al antígeno y a la afinidad, directa o indirectamente. El índice de la tendencia al contacto con el antígeno, así como también la incidencia de los aminoácidos en las bases de datos de líneas germinales humanas en cada posición también son extremadamente importantes a la hora de decidir si un residuo determinado se puede mutar de forma segura desde la secuencia de ratón hacia la secuencia humana. La humanización de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 3A4 implica 11 mutaciones en su marco humanizado propuesto para una humanización del marco de un 100%. La humanización de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 3A4 implica 23 mutaciones en su marco humanizado propuesto para una humanización del marco de un 100%. Estas secuencias de regiones variables 100% humanizadas se denominan Lvh1 y Hvh1, respectivamente (SEQ ID NOs:33 y 38). También se diseñaron secuencias humanizadas adicionales en las cuales se conservaron varios residuos de las secuencias de ratón de 3A4, basándose en análisis estructurales y de comparación de las secuencias meticulosos que indican la existencia de una elevada probabilidad de alterar la afinidad de unión al antígeno si las mutaciones se introducen en estas posiciones. Estas secuencias de las regiones variables se denominan Lvh2, Hvh2, Hvh3 y Hvh4 (SEQ ID NOs: 34, 39, 40 y 41).

25 Las dos variantes humanizadas de la cadena ligera (incluida la región constante) se identifican en la presente como Lh1 (SEQ ID NO.: 43) y Lh2 (SEQ ID NO.:44). Las cuatro variantes humanizadas de la cadena pesada (incluida la región constante) se identifican en la presente como Hh1 (SEQ ID NO.:46), Hh2 (SEQ ID NO.:47), Hh3 (SEQ ID NO.:48) y Hh4 (SEQ ID NO.:49). Las dos cadenas ligeras humanizadas y las 4 cadenas pesadas humanizadas se pueden acoplar para formar 8 anticuerpos humanizados (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3, Lh1Hh4, Lh2Hh1, Lh2Hh2, Lh2Hh3 y Lh2Hh4). Se construyeron modelos moleculares para todas estas combinaciones mediante modelización por homología, partiendo del modelo 3D de la región variable de 3A4 de murino, y se representan en las Figuras 9a-9h.

En el caso de la secuencia humanizada de la cadena ligera de 3A4 Lvh2 (SEQ ID NO:34), se conservaron los residuos marco Val-L2 y Lys-L45 de la secuencia de ratón, ya que el residuo L2 queda semienterrado, está en contacto con CDR-L1 y CDR-L3 y tiene tendencia a entrar en contacto con el antígeno, mientras que el residuo L45 se dirige a la cadena pesada. Cabe destacar que estos dos residuos de murino pueden estar presentes en marcos humanos. En el caso de la secuencia humanizada de la cadena pesada de 3A4 Hvh2 (SEQ ID NO:39), se conservaron los residuos marco Ile-H2 y Lys-L73 de la secuencia de ratón, ya que el residuo H2 queda semienterrado, está en contacto con CDR-H1 y CDR-H3 y tiene tendencia a entrar en contacto con el antígeno, mientras que el residuo H73 pertenece a la zona de Vernier que soporta CDR-H2, y estos dos residuos de murino pueden estar presentes en marcos humanos. En el caso de la secuencia humanizada de la cadena pesada de 3A4 Hvh3 (SEQ ID NO:40), se conservaron las retromutaciones de Ile-H2 y Lys-L73 y, además de esto, se conservaron los residuos marco Ile-H48, Ala-H67, Leu-H69 y Val-H71 de la secuencia de ratón, ya que todos estos residuos de murino adicionales son residuos enterrados y pertenecen a la zona de Vernier que soporta CDR-H2, y además el residuo de murino H71 puede estar presente en marcos humanos. En el caso de la secuencia humanizada de la cadena pesada de 3A4 Hvh4 (SEQ ID NO:41), se incluyeron las 6 retromutaciones de la variante humanizada Hvh3 más dos residuos marco de ratón adicionales Lys-H38 y Lys-H66, ya que representan residuos semienterrados cercanos a CDR-H2. Las secuencias de aminoácidos resultantes de las cadenas humanizadas y de murino se enumeran en la Tabla 1. El alineamiento de las regiones variables de la cadena ligera humanizada y de murino se muestra en la Figura 10a y el alineamiento de las regiones variables de la cadena pesada humanizada y de murino se muestra en la Figura 10b.

Las Figuras 11a y 11b muestran un alineamiento de la región variable de la cadena ligera de murino con la región variable de la cadena ligera 100% humanizada y la región variable de la cadena pesada de murino con la región variable de la cadena pesada 100% humanizada, respectivamente. Esta figura ilustra los aminoácidos que se conservaron y aquellos que se seleccionaron para la sustitución.

Ejemplo 7

Acoplamiento y expresión de los anticuerpos variantes humanizados 3A4

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

Construcción de un plásmido que codifica las cadenas ligera y pesada (de murino) quiméricas de 3A4

Las cadenas ligera y pesada del anticuerpo quimérico se amplificaron por PCR a partir de las cadenas de inmunoglobulina de murino originales utilizando los siguientes pares de cebadores de oligonucleótidos: cadena pesada, 5'-oligo codificado por la SEQ ID NO: 50 y 3'-oligo codificado por la SEQ ID NO:51; cadena ligera, 5'-oligo codificado por la SEQ ID NO: 52 y 3'-oligo codificado por la SEQ ID NO:53. Los productos de PCR resultantes se digirieron con Hind III y se clonaron en pK-CR5 (SEQ ID NO:21), que se había digerido previamente con Hind III.

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

Los fragmentos codificantes de la región de la cadena pesada humanizada del anticuerpo 3A4 (Hh1, Hh2, Hh3 y Hh4) se adquirieron de GenScript (Piscataway, EE. UU.). Los fragmentos de ADN que incluían las secuencias del codón de parada y de kozak se digirieron con HindIII y se clonaron en el sitio HindIII del plásmido pK-CR5, previamente desfosforilado con fosfatasa intestinal de ternera (NEB) para evitar la recircularización. La Figura 12a muestra el mapa del plásmido pK-CR5-3A4-HC-variante 1. Todas las variantes de la cadena pesada de 3A4 humanizado se construyeron de modo similar.

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

Los fragmentos codificantes de las regiones de la cadena ligera humana del anticuerpo 3A4 (Lh1 y Lh2) se adquirieron de GenScript. Los fragmentos de ADN que incluían las secuencias del codón de parada y de kozak se digirieron con BamHI y se clonaron en el sitio BamHI del plásmido pMPG-CR5 (SEQ ID NO:55), previamente desfosforilado con fosfatasa intestinal de ternera (NEB) para evitar la recircularización. La Figura 12b muestra el mapa del plásmido pMPG-CR5-3A4-LC-variante 1. Todas las variantes de la cadena ligera de 3A4 humanizado se construyeron de modo similar.

Estudio de transfección transitoria

Se aisló el ADN plasmídico a partir de pequeños cultivos de *E. coli* utilizando el kit Mini-Prep (Qiagen Inc, Mississauga, ON) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Resumiendo, se inocularon 2 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina con una única colonia seleccionada tras la ligación y transformación. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante toda la noche con agitación enérgica (250 RPM). A continuación, el plásmido se aisló a partir de 1.5 ml de cultivo utilizando los protocolos, tampones y columnas proporcionados en el kit. El ADN se eluyó utilizando 50 µl de agua estéril. Se aisló el ADN plasmídico a partir de grandes cultivos de *E. coli* utilizando el kit Plasmid Plus Maxi (Qiagen Inc, Mississauga, ON) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se inocularon 200 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina con una única colonia fresca de *E. coli* y se incubaron durante toda la noche a 37 °C con agitación enérgica (250 RPM). Se formaron pellets de las bacterias (130 ml de cultivo para la cadena pesada y 180 ml de cultivo para la cadena ligera) por centrifugación a 6000 x g, durante 15 min, a 4 °C y el plásmido se aisló utilizando los protocolos, tampones y columnas proporcionados en el kit. Los plásmidos puros se volvieron a suspender en Tris 50 mM estéril de pH 8 y se cuantificaron midiendo la densidad óptica a 260 nm. Antes de la transfección, el plásmido purificado se esterilizó por extracción con fenol/cloroformo seguida de precipitación en etanol. El plásmido se volvió a suspender en Tris 50 mM estéril de pH 8 y se cuantificó mediante la densidad óptica a 260 nm.

Antes de la transfección, las células (CHO-cTA) se lavaron con PBS y se volvieron a suspender con una concentración de 4.0×10^6 células/ml en medio de cultivo (CD-CHO, Invitrogen) sin sulfato de dextrano durante 3 h en cultivo de suspensión. Para cada combinación plasmídica, se transfectaron 45 ml de células añadiendo lentamente 5 ml de medio CDCHO suplementado con 10 µg/ml de cada plásmido y 50 µg/ml de polietilenimina (PEI Max; Polysciences). La concentración final fue de 1 µg/ml de cada plásmido y 5 µg/ml de PEI. Después de 2 h, las células se transfectaron a 30°C. Los días siguientes, se añadieron 50 µg/ml de sulfato de dextrano y 3.75 ml de cada suplemento (Efficient Feed A y B de Invitrogen) a las células y se incubaron a 30°C durante 13 días. Se añadieron 2.5 ml de Feed A y 2.5 ml de Feed B los días 4, 6, 8 y 11. El día 13 se clarificó el sobrenadante por centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

Las células CHO (CHOcTA) se transfectaron con los plásmidos que codificaban las diferentes variantes de las cadenas ligera y pesada humanizadas del anticuerpo 3A4, regulados por el promotor CR5. Se realizó la transfección con diferentes combinaciones de cadenas ligera y pesada. A modo de control, también se transfectaron células con plásmidos que codificaban el anticuerpo quimérico/de murino.

Purificación del anticuerpo

Se concentraron 15 ml de sobrenadante de las transfecciones de células CHO por centrifugación utilizando el casete de Amicon Ultra (Ultracell-50k) a 1500 rpm. El anticuerpo concentrado (550 µl) se purificó utilizando el kit Nab spin Protein A Plus (Thermo Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. A continuación, los anticuerpos purificados se desalaron utilizando PBS y el casete concentrador de Amicon Ultra (Ultracell-10K) a 2500 rpm hasta un volumen final de 250 µl. El anticuerpo purificado se cuantificó mediante la lectura de la DO_{280} utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y se conservó congelado a -20 °C. Se volvió a suspender una alícuota del anticuerpo

purificado en un volumen equivalente de Laemmli 2X, se calentó hasta 95 °C durante 5 min y se enfrió con hielo. Se hizo una curva patrón utilizando una cantidad conocida de IgG1 kappa humana purificada de plasma de mieloma humano (Athens Research). Las muestras se separaron en un gel de poliácridamida Novex con un 10% de Tris-glicina (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-N (Amersham Bioscience Corp., Baie d'Urfée, QC) durante 1 h a 275 mA. La membrana se bloqueó durante 1 h con un 0.15% de Tween 20 y un 5% de leche descremada en PBS, y se incubó durante 1 h con un anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H+L) conjugado con Cy5 (Jackson, Cat# 109-176-099). La señal se detectó y cuantificó mediante un escaneado con el escáner Typhoon Trio+ (GE Healthcare). Según se muestra en la Figura 13, todas las combinaciones de las variantes del anticuerpo humanizado 3A4 se expresaron en células CHO.

Ejemplo 8

Análisis cinético del anticuerpo 3A4 humanizado y de murino

Suministros

Los chips sensores GLM, el kit de acoplamiento de aminos Biorad ProteOn (EDC, sNHS 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). La solución de Tween 20 al diez por ciento se adquirió de Teknova (Hollister, CA). El anticuerpo de cabra específico anti-fragmento Fc de IgG humana se adquirió de Jackson ImmunoResearch. La columna de filtración en gel Superdex 75 10/300 GL se adquirió de GE Healthcare.

Filtración en gel

La proteína KAAG1 se inyectó en la columna Superdex G75 con una concentración de 3.114 mg/ml y un volumen de 220 μ l. La separación se llevó a cabo a 0.4 ml/min en tampón de análisis HBST (remítase más adelante) sin Tween 20. El volumen de las fracciones recolectadas fue de 500 μ L. La concentración de KAAG1 en cada una de las fracciones se determinó mediante la DO_{280} utilizando un coeficiente de extensión de 5500 y un PM de 8969. La Figura 14 representa el perfil de la filtración en gel de KAAG1. A aproximadamente 11 ml se eluye un pico pequeño de un posible agregado. La proteína eluida a los 13 ml se utilizó como analito para el ensayo de SPR (fracciones 15–19).

Ensayos con biosensores de SPR

Todos los ensayos de resonancia de plasmones superficiales se llevaron a cabo utilizando un instrumento BioRad ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories Ltd. Mississauga, ON) con tampón de análisis HBST (HEPES 10mM, NaCl 150 mM, EDTA 3.4 mM y un 0.05% de Tween 20 de pH 7.4) a una temperatura de 25 °C. La superficie de captura de anti-Fc de ratón se generó utilizando un chip sensor GLM activado mediante una dilución 1:5 de las soluciones estándar BioRad sNHS/EDC inyectadas durante 300 s a 30 μ l/min en la dirección del analito (horizontal). Inmediatamente después de la activación, se inyectó una solución 13 μ g/ml específica anti-fragmento Fc de IgG humana en NaOAc 10 mM de pH 4.5 en la dirección del analito con una tasa de flujo de 25 μ l/min hasta que se inmovizaron aproximadamente 8000 unidades de resonancia (UR). Los grupos activos remanentes se desactivaron con una inyección de 30 μ l/min de etanolamina 1 M durante 300 s en la dirección del analito, lo cual también garantiza que se creen espacios activados por simulación para la referencia del blanco. El cribado de las variantes de 3A4 para su unión a KAAG1 se realizó en dos pasos: una captura indirecta de las variantes de 3A4 del sobrenadante de las células sobre la superficie específica anti-fragmento Fc de IgG humana en la dirección del ligando (vertical) seguida de una inyección de KAAG1 en la dirección del analito. En primer lugar, se utilizó una inyección de 100 μ l/min de tampón durante 30 s en la dirección del ligando para estabilizar la línea de base. Para cada captura de 3A4, las variantes de 3A4 no purificadas en medio de cultivo celular se diluyeron hasta un 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 origen natural en canales de ligando individuales durante 240 s con un flujo de 25 μ l/min. Esto dio como resultado una captura de 3A4 saturante de aproximadamente 400-700 UR sobre la superficie específica anti-fragmento Fc de IgG humana. El primer canal de ligando se dejó vacío para utilizarlo como un control del blanco, cuando fuera necesario. Inmediatamente después de este paso de captura de 3A4, se realizaron dos inyecciones de tampón en la dirección del analito para estabilizar la línea de base y a continuación se inyectó el KAAG1 purificado por filtración en gel. Para un cribado típico, se inyectaron simultáneamente cinco concentraciones de KAAG1 (8, 2.66, 0.89, 0.29 y 0.098 nM) y control de tampón en canales de analito individuales con un flujo de 50 μ l/min durante 120 s con una fase de disociación de 600 s, lo cual dio como resultado un conjunto de sensogramas de unión con una referencia de tampón para cada una de las variantes de 3A4 capturadas. Los complejos de superficie específica anti-fragmento Fc de IgG humana – 3A4 se regeneraron con un pulso de 18 s de ácido fosfórico al 0.85% durante 18 s con un flujo de 100 μ l/min para preparar la superficie específica anti-fragmento Fc de IgG humana para el siguiente ciclo de inyección. Los sensogramas se alinearon y se referenciaron doblemente utilizando la inyección de blanco de tampón y espacios intermedios, y los sensogramas resultantes se analizaron utilizando el software ProteOn Manager v3.0. Los valores cinéticos y de afinidad se determinaron ajustando los sensogramas referenciados al modelo de unión de Langmuir 1:1 utilizando $R_{m\acute{a}x}$ local, y las constantes de afinidad (K_D , M) se obtuvieron a partir de las constantes de velocidad resultantes (k_d s⁻¹/ k_a M⁻¹s⁻¹).

Determinación de las constantes de velocidad y afinidad

La Figura 15 resume las constantes de velocidad de asociación (k_a , 1/Ms) y disociación (k_d , 1/s), así como también las constantes de afinidad (K_D , M) para la interacción de KAAG1 con 3A4 de murino purificado, 3A4 de murino expresado de forma transitoria como una variante quimérica y expresado de forma transitoria como una variante humanizada. Estas constantes se representan gráficamente en la Figura 16. La constante de velocidad de asociación es muy similar para la variante de 3A4 progenitora pura, quimérica y humanizada (Figura 16a). La constante de velocidad de disociación es similar para 3A4 quimérico expresado de forma transitoria en comparación con el 3A4 progenitor puro, lo cual sugiere que el procedimiento de transfección no alteró los parámetros de la interacción de KAAG1 con el anticuerpo (Figura 16b). Sin embargo, al parecer todas las variantes humanizadas tienen una velocidad de disociación ligeramente alterada, es decir, una velocidad de disociación más elevada (Figura 16b). Esto se refleja en las constantes de afinidad (Figura 16c). En resumen, existe una correlación lineal entre la afinidad de unión ($\log K_D$) de la variante humanizada y el número de retromutaciones realizadas en el anticuerpo progenitor (LcHc), con una reducción de la afinidad de unión a medida que aumenta el número de mutaciones. Sin embargo, la diferencia en la afinidad de unión solo es de un factor de 4 entre la peor variante (H1L1, 0.47 nM), la cual no presenta ningún residuo de ratón conservado, y la mejor variante, la cual tiene 10 residuos de ratón conservados (H4L2, 0.1 nM). Finalmente, se ha observado que la afinidad de unión de todas las variantes por KAAG1 es subnanomolar y la mejor variante (H4L2, 0.1 nM) presentó una afinidad aproximadamente 6 veces más débil que la de murino (LcHc, 0.057 nM). En general, estos resultados indican que la humanización se llevó a cabo con éxito, ya que todas las variantes presentaron una afinidad muy elevada por KAAG1.

Ejemplo 9**Unión de variantes humanizadas de 3A4 a KAAG1 en un ensayo de ELISA**

También se utilizaron métodos de ELISA para comparar la actividad de unión de las variantes de 3A4 humanizadas con el anticuerpo 3A4 de murino. Se aplicó KAAG1 humano recombinante como recubrimiento en placas de 96 pocillos durante toda la noche, se lavó y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con cantidades cada vez mayores de variantes de 3A4 humanizadas o de murino. Tras otra ronda de pasos de lavado, se añadió un anticuerpo anti-humano conjugado con HRP a los pocillos y el anticuerpo 3A4 unido se midió calorimétricamente a Abs_{450} . Según se muestra en la Figura 17A, las variantes humanizadas (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3 y Lh1Hh4) presentaron una unión muy similar a KAAG1 en comparación con 3A4 de murino (LcHc). Este resultado indicó que las cuatro variantes de la cadena pesada humanizadas eran comparables a la cadena pesada h3A4 original cuando se acoplaban con la variante L1 de la cadena ligera humanizada. La Figura 17B muestra los resultados cuando las variantes de la cadena pesada se acoplaron con la variante Lh2 de la cadena ligera humanizada de 3A4. En este caso, existe una diferencia en la unión de las variantes. Por ejemplo, Lh2hh4 fue la variante con el perfil más similar en comparación a 3A4 de murino. Esto concuerda con los datos de SPR (remítase al Ejemplo 3), los cuales mostraron que la variante 4 de la cadena pesada presentaba la mayor afinidad por KAAG1. Considerados conjuntamente, estos resultados de unión muestran que las variantes humanizadas interactúan todas ellas con KAAG1 humano en este ensayo. Aunque hubo algunas diferencias sutiles, la unión en el ensayo de ELISA concordó con los resultados de SPR.

Ejemplo 10**Unión de las variantes humanizadas de 3A4 en la superficie de células cancerosas**

Se utilizó citometría de flujo para evaluar la capacidad de las variantes de 3A4 humanizadas para interactuar con KAAG1 expresado en la superficie de células cancerosas. Con este fin, se incubaron células de cáncer de ovario SKOV-3, que se había demostrado previamente que se unían de forma eficaz a 3A4 mediante citometría de flujo, con las ocho variantes humanizadas y el anticuerpo de murino original. Resumiendo, las células SKOV-3 se desprendieron 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 pasos de lavado, las células se incubaron con el anticuerpo secundario, anti-IgG humana conjugado con FITC, durante 1 h en hielo. Se midió la fluorescencia de la superficie celular con un citómetro de flujo y los valores se muestran en el histograma de la Figura 18. Según se muestra, todas las variantes pudieron detectar KAAG1 en la superficie de células no permeabilizadas y las señales más intensas se obtuvieron con la concentración más elevada de los anticuerpos 3A4 (3 mg/ml) y se redujeron a medida que la concentración del anticuerpo se redujo. Entre las diferentes variantes, las que poseían más retromutaciones de murino (Figura 18, remítase a Lh1Hh4 y Lh2Hh4) interactuaron con KAAG1 en la superficie de las células con la mayor actividad. De hecho, al parecer Lh1Hh4 y Lh2hh4 presentaron una unión a KAAG1 en la superficie celular ligeramente mejorada en comparación con el anticuerpo 3A4 de murino (LcHc).

PUBLICACIONES

- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ y Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.
- Menon U, Skates SJ, Lewis S, Rosenthal AN, Rufford B, Sibley K, Macdonald N, Dawnay A, Jeyarajah A, Bast RC

- Jr, Oram D y Jacobs IJ. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(31):7919-26.
- 5 - Bonome T, Lee JY, Park DC, Radonovich M, Pise-Masison C, Brady J, Gardner GJ, Hao K, Wong WH, Barrett JC, Lu KH, Sood AK, Gershenson DM, Mok SC y Birrer MJ. Expression profiling of serous low malignancy potential, low grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res* 2005; 65: 10602-10612.
 - Chambers, A y Vanderhyden, B. Ovarian Cancer Biomarkers in Urine. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2): 323-327.
 - 10 - Berek *et al.* *Cancer Medicine*. 5.^a ed. Londres: B.C. Decker, Inc.; 2000. págs. 1687-1720.
 - Bristow R.E. Surgical standards in the management of ovarian cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 474-480.
 - 15 - Brown E, Stewart M, Rye T, Al-Nafussi A, Williams AR, Bradburn M, Smyth J y Gabra H. Carcinosarcoma of the ovary: 19 years of prospective data from a single center. *Cancer* 2004; 100: 2148-2153.
 - Shih L-M y Kurman RJ. Molecular Pathogenesis of Ovarian Borderline Tumors: New Insights and Old Challenges. *Clin Cancer Res* 2005; 11(20): 7273-7279.
 - 20 - Seidman JD, Russell P, Kurman RJ. Surface epithelial tumors of the ovary. En: Kurman RJ, editor. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 5.^a ed. Nueva York: Springer-Verlag; 2002. págs. 791-904.
 - Cannistra SA y McGuire WP. Progress in the management of gynecologic cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(20): 2865-2866.
 - 25 - Oei AL, Sweep FC, Thomas CM, Boerman OC, Massuger LF. The use of monoclonal antibodies for the treatment of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* 2008; 32(6): 1145-1157.
 - Nicodemus CF y Berek JS. Monoclonal antibody therapy of ovarian cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2005; 5(1): 87-96.
 - 30 - Burger RA. Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(20): 2902-2908.
 - 35 - Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, Kim NW. B7-H4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(3): 1570-1575.
 - Ebel W, Routhier EL, Foley B, Jacob S, McDonough JM, Patel RK, Turchin HA, Chao Q, Kline JB, Old LJ, Phillips MD, Nicolaidis NC, Sass PM, Grasso L. Preclinical evaluation of MORab-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. *Cancer Immun.* 2007; 7: 6-13.
 - 40 - Van den Eynde BJ, Gaugler B, Probst-Kepper M, Michaux L, Devuyst O, Lorge F, Weynants P, Boon T. A new antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med.* 1999; 190(12): 1793-1799.
 - 45 - Sooknanan R, Tremblay GB, Filion M. Polynucleotides and polypeptide sequences involved in cancer. 2007; PCT/CA2007/001134 publicada con el N.º WO/2007/147265 el 27 de diciembre de 2007.
 - Schumacher J, Anthoni H, Dahdouh F, König IR, Hillmer AM, Kluck N, Manthey M, Plume E, Warnke A, Remschmidt H, Hülsmann J, Cichon S, Lindgren CM, Propping P, Zucchelli M, Ziegler A, Peyrard-Janvid M, Schulte-Körne G, Nöthen MM, Kere J. Strong genetic evidence of *DCDC2* as a susceptibility gene for dyslexia. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 78: 52-62.
 - 50 - Cope N, Harold D, Hill G, Moskvina V, Stevenson J, Holmans P, Owen MJ, O'Donovan MC, Williams J. Strong evidence that *KIAA0319* on chromosome 6p is a susceptibility gene for developmental dyslexia. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 76: 581-591.
 - 55 - Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T, Yue L, Bray-Ward P y Ward DC. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *PNAS* 2005; 102: 7677-7682.
 - 60 - Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, Su F, Luong MN, Luong SA, Reddy ST y Farias-Eisner R. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *PNAS* 2003; 100: 12343-12348.
 - 65 - Benoît MH, Hudson TJ, Maire G, Squire JA, Arcand SL, Provencher D, Mes-Masson AM, Tonin PN. Global analysis of chromosome X gene expression in primary cultures of normal ovarian surface epithelial cells and epithelial

ovarian cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 2007; 30(1): 5-17.

- 5 - Cody NA, Zietarska M, Filali-Mouhim A, Provencher DM, Mes-Masson AM, Tonin PN. Influence of monolayer, spheroid, and tumor growth conditions on chromosome 3 gene expression in tumorigenic epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Med. Genomics* 2008; 1(1) :34.
- Buechler J, Valkirs G, Gray J. Polyvalent display libraries.2000; U.S. 6.057.098.
- 10 - Durocher Y, Kamen A, Perret S, Pham PL. Enhanced production of recombinant proteins by transient transfection of suspension-growing mammalian cells. 2002; solicitud de patente canadiense n.º CA 2446185.
- Durocher Y. Expression vectors for enhanced transient gene expression and mammalian cells expressing them. 2009; solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 60/662.392.
- 15 - Tremblay GB, Filion M. Antibodies that specifically block the biological activity of a tumor antigen. 2009; documento PCT/CA2009/001586.
- Durocher Y, Kamen A, Perret S, Pham PL. Enhanced production of recombinant proteins by transient transfection of suspension-growing mammalian cells. 2002; solicitud de patente canadiense N.º CA 2446185 (publicada como CA 2446185C).
- 20 - Durocher Y. Expression vectors for enhanced transient gene expression and mammalian cells expressing them.2004; solicitud de patente de EE. UU. N.º 60/662,392.
- 25 - Chang MH, Karageorgos LE, Meikle PJ. CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). 2002; *J Biol Regul Homeost Agents.* 16:147-51.
- Abhinandan, KR y Martin, ACR. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. 2008; *Mol Immunol*, 45, 3832-3839.

30

Secuencias mencionadas en la descripción

SEQ ID NO.:1 – secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 3A4

CAGATCCAGTTGGTGAATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGTAAG
 GCTTCTGGATACACATTCAGTACGACTACATGAGCTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAG
 TGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTAATACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATA
 TTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCGGAAGACTCAGCA
 GTCTATTACTGTGCAAGAGACCCGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
 TCA

35

SEQ ID NO.:2 – secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena pesada de 3A4

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNYNQKFKGKAI
 LTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQTSVTVSS

40

SEQ ID NO.:3 – secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 3A4

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGGCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC
 AGATCTAGTCAGAGCCTTCTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTTCAGAAACCAGGC
 CAGTCTCCAAAGCTCCTGATCCACACAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGC
 AGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTAC
 TGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAGGCTGGAGCTGAAA

45

SEQ ID NO.:4 – secuencia polipeptídica de la región variable de la cadena ligera de 3A4

DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHNSGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFGVDPDRFSG
 SGGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPLTFGAGTRLELK

SEQ ID NO.:5 – secuencia polipeptídica de CDR1 de la cadena pesada de 3A4

ES 2 743 913 T3

GYTFTDDYMS

SEQ ID NO.:6 – secuencia polipeptídica de CDR2 de la cadena pesada de 3A4
DINPYNGDTN

5

SEQ ID NO.:7 – secuencia polipeptídica de CDR3 de la cadena pesada de 3A4
DPGAMDY

10

SEQ ID NO.:8 – secuencia polipeptídica de CDR1 de la cadena ligera de 3A4
RSSQSLLHSNGNTYLE

SEQ ID NO.:9 – secuencia polipeptídica de CDR2 de la cadena ligera de 3A4
TVSNRFS

15

SEQ ID NO.:10 – secuencia polipeptídica de CDR3 de la cadena ligera de 3A4
FQGSHVPLT

SEQ ID NO.:11 – OGS1773
GTAAGCAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC

20

SEQ ID NO.:12 – OGS1774
GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC

25

SEQ ID NO.:13 – secuencia de nucleótidos constante kappa humana

GCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC
CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO.:14 – secuencia polipeptídica constante kappa humana

AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

SEQ ID NO.:15

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCC
 TCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTGAGTTTCCAAAACGAGGAGGATTTGATATTCA
 CCTGGCCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCC
 ACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGG
 AGCCTTGCCTTGTGCTCTACTCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTTGAGACGGAGCTTACAGCGCT
 GTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTT
 GTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
 TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
 CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTG
 AGCTCGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGGTACCAGCGCCCGCTTCGAATGAGATC
 CCCCAGCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGT
 GTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTA
 GAGCCCCGCCCGGACGAACATAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCTTCTTCGCGGGGCGAGTGCATG
 TAATCCCTCAGTTGGTTGGTACAACCTGCCAAGTGGCCCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGACC
 AAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGA
 GTGGCTTTCATCTGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATGCTTTTATGTGTAAC
 CTTGGCTGAAGCTTTACACCAATGTGGGGGACATGTACCTCCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAG
 GCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA
 ATAGTGTTTATAAGGCCCTTGTAAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGTAGTAGTATATAC
 TATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTT
 AGTAAAAGGGTCTAAGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGG
 TCAGGATTCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCAACAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAGGAGCGGGCA
 GTGAACTCTCCTGAATCTTCGCTGCTTCTTTCATCTCCTTCGTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGT
 TGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCAGAATAAAATTT
 GGACGGGGGGTTAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCCTCACAACCCCTTGGGCAATA
 AATACTAGTGTAGGAATGAACATTCTGAATATCTTAAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCC
 GTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCATATGA
 TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTT
 GTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTGTCTCTAACACCCCGAAA
 ATTAACGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTGAAATTG
 TGGAGTGGGGGCACCGCTCAGCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGAAT
 AACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCACAAAACCACTAATGGCAC
 CCCGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAGGAC
 AAATTACACACACTTGCCTGAGCGCAAGCACAGGGTTGTTGGTCTCATATTCACGAGGTGCTGA
 GAGCAGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
 TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATA
 TCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAG
 CATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTA
 TCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCCAAATAT
 CTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC

ATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTAT
 CCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTA
 TATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCACCAGTATAAGCTG
 TCAAACATGAGAATTAATCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTC
 ATGATAATAATGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT
 TTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAA
 TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTT
 TGCCCTTCCTGTTTTTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
 CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGT
 TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAA
 GAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAG
 CATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCG
 GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGAT
 CATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
 ACGATGCCTCGAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC
 CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTCCG
 GCTGGCTGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCGAGCACTG
 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
 CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACAGCAAGTTTAC
 TCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
 GATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG
 ATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTGCAAACAAAAAACACCAG
 CTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGC
 AGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGCTGTA
 GCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGT
 CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGTGAACGGGGGGTTCCG
 TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAA
 AGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAG
 CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTTCCGCACCTCTGA
 CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGGCC
 TTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCTGATTCT
 GTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGC
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATT
 CATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAGCGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTG
 AGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATT
 GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTC
 GACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGCAGATCCGGGCAACGTTGTTGCATTGCTGACGGCGCA
 GAAGTGGTAGGTATGGCAGATCTATACATGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTCATTGGTTA

ES 2 743 913 T3

TATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAAATATGTACATTTA
TATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT
TACGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCCGCC
TGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
AGGGACTTTCATGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCCTGGCATTATGCCCA
GTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
GATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCA
CCCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAATAA
CCCCGCCCCGTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTT
AGTGAACCGTCAAGTCCCTACTCTCTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTT
GAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTC
CGCCACCGAGGGACTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAAC
AGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGACGGGTGGCGGTGGGGTTGTTTCTGG
CGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO.:16 – OGS18500
ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGTGATGACCCAAACTCC

5

SEQ ID NO.:17 – OGS2084
GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTCCG

10 SEQ ID NO.:18 – OGS1769
GTAAGCGCTAGCGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTCCCCTGGCCCC

SEQ ID NO.:19 – OGS1770
GTAAGCGAATTCACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG

15 SEQ ID NO.:20 – secuencia de nucleótidos de la región CH1 de inmunoglobulina humana

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCA
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT

20 SEQ ID NO.:21 – secuencia polipeptídica de la región CH1 de inmunoglobulina humana

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

SEQ ID NO.:22

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCC
TCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGAGGAGGATTGATATTCA
CCTGGCCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCC
ACTCCCAGGTCCAAGTTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGG
GTTCCAGGTTCCACTGGCGGAGACGGAGCTTACGGGCCATCTGTCTTTCCCTGGCCCCCTCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTGTGAATCACTCACAC
ATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAAACCCAA
GGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAATAACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCFACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGATCCCCGACCTCGACCTCTG
GCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGA
CATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCCGGACG
AACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCCCTTCTTCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTCAGTTGGTT
GGTACAACCTTGCCAACTGAACCCATAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGTAGTAGTATATACTATCCAG
ACTAACCCTAATTAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAA
GGGTCTAAGGAACAGCGATGTAGGTGGCGGGCCAAGATAGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAGGAC
AAATTACACACTTGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTGTGGTCTCATATTCACGAGGTGCTGA
GAGCAGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATA
TCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAG
CATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTA
TCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCCAAATAT
CTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC
ATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTAT
CCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTA
TATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCACGATGATAAGCTG
TCAAACATGAGAATTAATCTTGAAGACGAAAGGCCCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTC
ATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT
TTATTTTCTAAAATACATCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGATAAATGCTTCAATAA
TATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTT
TGCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGT

TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAA
 GAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAG
 CATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCG
 CCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAACATGGGGGAT
 CATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
 ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC
 CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCG
 GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATGTCAGCACTG
 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
 CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTAC
 TCATATATACTTTAGATTGATTTAAAAC TTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
 GATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG
 ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCG
 CTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC TGCGTTCAGC
 AGAGCGCAGATACCAAAATACTGCTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
 GCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGCGTCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGT
 CTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTCCG
 TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAA
 AGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG
 CGCAGGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGA
 CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACCCAGCAACCGGCC
 TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGCTTTTGTCTACATGTTCTTCC TGCGTTATCCCCTGATCTT
 GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGC
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGA
 TTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCG
 GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATA
 ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG
 TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGAC
 GGTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATC
 TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGG
 TTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACAAAAT
 CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
 TGGGAGGTCTATAAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTC
 TGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGCTTTCCAGTACTCTTGGATC
 GGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATC
 GGAAAACCTCTCGAGAAAGCGTCTAACCAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGG
 CAGCGGGTGGCGGTCGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAGTAGGCGGT

5 SEQ ID NO.:23 – OGS1879
 GGGTTCCAGGTTCCACTGGCCAGATCCAGTTGGTGCAATCTGG

SEQ ID NO.:24 – OGS1810
 GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAGGC

10 SEQ ID NO.:25
 GTAAGCGGATCCATGGATGACGACGCGGCC

SEQ ID NO.:26
 GTAAGCAAGCTTAGGCCGCTGGGACAGCGGAGGTGC

15 SEQ ID NO.:27
 GTAAGCAAGCTTGGCAGCAGCGCCAGGTCCAGC

SEQ ID NO.:28

GAGGGGCATCAATCACACCCGAGAAGTCACAGCCCCCTCAACCCTGAGGTGTGGGGGGGTAGGGATCTGC
 ATTTCTTCATATCAACCCACACTATAGGGCACCTAAATGGGTGGCGGTGGGGGAGACCGACTCACTT
 GAGTTTCTTGAAGGCTTCCCTGGCCTCCAGCCACGTAATTGCCCGCTCTGGATCTGGTCTAGCTTCCG
 GATTCGGTGGCCAGTCCGCGGGGTGTAGATGTTCTTGACGGCCCCAAAGGTGCCTGAACGCCCGCGT
 CACCTCCTCAGGAAGACTTCGAAGCTGGACACCTTCTTCTCATGGATGACGACGCGGGCGCCCCGCGTA
 GAAGGGTCCCCGTTGCGGTACACAAGCACGCTCTTCACGACGGGCTGAGACAGGTGGCTGGACCTGGC
 GCTGCTGCCGCTCATCTTCCCCGCTGGCCGCCCTCAGCTCGCTGCTTCGCGTGGGAGGCACCTCCG
 CTGTCCAGCGGCTCACCGCACCCAGGGCGCGGGATCGCCTCTGAAACGAACGAGAACTGACGAAT
 CCACAGGTGAAAGAGAAGTAACGGCCGTGCGCCTAGGCGTCCACCCAGAGGAGACACTAGGAGCTTGCA
 GGACTCGGAGTAGACGCTCAAGTTTTTACCCTGGCGTGCACAGCCAATCAGGACCCGCGAGTGCAGCG
 CCACACCAGGTTACCTGCTACGGGCAGAATCAAGTGGACAGCTTCTGAGCAGGAGCCGAAACGCGC
 GGGCCTTCAACAGGCACGCTAGTGAGGGCAGGAGAGGAGGAGCGCACACACACACACACACAA
 ATATGGTGAAACCAATTTCTTACATCATATCTGTGCTACCCTTTCCAAACAGCCTA

5

SEQ ID NO.:29

MDDDAAPRVEGVPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAAHLPRWPPQLAASRREAPPLSQRPHRTQGAGSP
 PETNEKLTNPQVKEK

10 SEQ ID NO.:30 (región variable de la cadena ligera variante)

DXVMTQTPLSLXVXXGXASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSNRFSG
 VPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDXGVVYCFQGSHVPLTFGXGTXLEXK

15 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:4. La sustitución del aminoácido puede ser, por ejemplo, conservativa.

SEQ ID NO.:31 (región variable de la cadena ligera variante)

$DX_{a1}VMTQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{a7}LLIHT$
 $VSNRFSGVDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDX_{a8}GVVYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}$

20

K

25 donde X_{a1} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{a2} puede ser A o P;
 donde X_{a3} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;
 donde X_{a4} puede ser L o P;
 donde X_{a5} puede ser un aminoácido ácido;
 donde X_{a6} puede ser Q o P;
 donde X_{a7} puede ser un aminoácido básico;
 donde X_{a8} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 30 donde X_{a9} puede ser A o Q;
 donde X_{a10} puede ser un aminoácido básico; o
 donde X_{a11} puede ser un aminoácido hidrófobo,
 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido
 (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la
 35 SEQ ID NO.:4.

SEQ ID NO.:32 (región variable de la cadena ligera variante)

DX_{A1}VMTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{A7}LLIH
 TVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{A8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{A9}GTX_{A10}LEX_A
 11K

5 donde X_{A1} puede ser V o I
 donde X_{A2} puede ser A o P
 donde X_{A3} puede ser S o T
 donde X_{A4} puede ser L o P
 donde X_{A5} puede ser D o E
 donde X_{A6} puede ser Q o P
 donde X_{A7} puede ser K o Q
 10 donde X_{A8} puede ser L o V
 donde X_{A9} puede ser A o Q
 donde X_{A10} puede ser R o K, o
 donde X_{A11} puede ser L o I,
 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido
 15 (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la
 SEQ ID NO.:4.

SEQ ID NO.:33 (región variable de la cadena ligera 1 variante: Lvh1)

20 DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO.:34 (región variable de la cadena ligera 2 variante: Lvh2)

25 DVVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFGV
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO.:35 (región variable de la cadena pesada variante)

30 QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNGDTNY
 NQKFKGXXXXTXDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXTVTVSS

30 donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido
 (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la
 SEQ ID NO.:2. La sustitución del aminoácido puede ser, por ejemplo, conservativa.

SEQ ID NO.:36 (región variable de la cadena pesada variante)

35 QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}LEWX_b
 11GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDX_{b2}
 2AVYYCARDPGAMDYWGQGTXT_{b23}VTVSS

40 donde X_{b1} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b2} puede ser P o A;
 donde X_{b3} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b4} puede ser V o K;
 donde X_{b5} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b6} puede ser un aminoácido básico;
 donde X_{b7} puede ser S o A;
 45 donde X_{b8} puede ser H o P;
 donde X_{b9} puede ser un aminoácido básico;
 donde X_{b10} puede ser S o G;
 donde X_{b11} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b12} puede ser un aminoácido básico;
 50 donde X_{b13} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b14} puede ser I o T;
 donde X_{b15} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b16} puede ser un aminoácido hidrófobo;
 donde X_{b17} puede ser K o T;

donde X_{b18} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro;

donde X_{b19} puede ser Q o E;

donde X_{b20} puede ser N o S;

donde X_{b21} puede ser T o R;

5 donde X_{b22} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro; o

donde X_{b23} puede ser S o L;

donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:2.

10

SEQ ID NO.:37 (región variable de la cadena pesada variante)

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

15

donde X_{B1} puede ser I o V;

donde X_{B2} puede ser P o A;

donde X_{B3} puede ser M o V;

donde X_{B4} puede ser V o K;

donde X_{B5} puede ser M o V;

20

donde X_{B6} puede ser K o R;

donde X_{B7} puede ser S o A;

donde X_{B8} puede ser H o P;

donde X_{B9} puede ser K o Q;

donde X_{B10} puede ser S o G;

25

donde X_{B11} puede ser I o M;

donde X_{B12} puede ser K o R;

donde X_{B13} puede ser A o V;

donde X_{B14} puede ser I o T;

donde X_{B15} puede ser L o I;

30

donde X_{B16} puede ser V o A;

donde X_{B17} puede ser K o T;

donde X_{B18} puede ser S o T;

donde X_{B19} puede ser Q o E;

donde X_{B20} puede ser N o S;

35

donde X_{B21} puede ser T o R;

donde X_{B22} puede ser S o T; o

donde X_{B23} puede ser S o L,

donde al menos uno de los aminoácidos identificados con una X corresponde a una sustitución de un aminoácido (conservativa o no conservativa) en comparación con el aminoácido correspondiente del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO.:2.

40

SEQ ID NO.:38 (región variable de la cadena pesada 1 variante: Hvh1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTN
YNQKFKGRVTITADTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLVTVSS

45

SEQ ID NO.:39 (región variable de la cadena pesada 2 variante: Hvh2)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY
NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLVTVSS

50

SEQ ID NO.:40 (región variable de la cadena pesada 3 variante: Hvh3)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
NQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLVTVSS

55

SEQ ID NO.:41 (región variable de la cadena pesada 4 variante: Hvh4)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
NQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLVTVSS

ES 2 743 913 T3

SEQ ID NO: 42 cadena (kappa) ligera de murino de 3A4

DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 SEQ ID NO:43 variante 1 de la cadena ligera (kappa) humanizada de 3A4; Lh1

DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID NO:44 variante 2 de la cadena ligera (kappa) humanizada de 3A4; Lh2

DVVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:45 cadena pesada (Igg1) de murino de 3A4

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNY
NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

15 SEQ ID NO:46 variante 1 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTN
YNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 SEQ ID NO:47 variante 2 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh2

ES 2 743 913 T3

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY
NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:48 variante 3 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh3

5 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
NQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:49 variante 4 de la cadena pesada (Igg1) humanizada de 3A4; Hh4

10 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
NQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:50
ATACCCAAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACAC

15 SEQ ID NO:51
ATACCCAAGCTTCATTTCCCGGGAGACAGGGAG

20 SEQ ID NO:52
ATACCCAAGCTTGGGCCACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGG

SEQ ID NO:53
ATACCCAAGCTTCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG

SEQ ID NO:54 pK-CR5

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT
TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGA
TAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCA
ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCC
TAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAG
CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAA
GAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGT
AACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTG
AGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCA
GTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGC
GAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCACATCGGGCGC
GCCAAATGATTTGCCCTCCCATATGTCCTTCCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCCAACAC
ACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTTTATTAGCCAGAGGTGAGATTTAATAAGCTTGC
TAGCAGATCTTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCA
TTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTTTTG
GAAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCA
ACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATCCGCCGTCTCAAGACCGCC
TACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCCCGACCGCCACCCGCT
GCCGCCCGCCACGGTGCTCAGCCTACCTTGCGACTGTGACTGGTTAGACGCCTTTCTC
GAGAGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTAC
CGTTCCGAGGCCGACGGGTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTG
TCCTCAACCGCGAGCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGAC
CGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATGGCG
TCTCCAGGCGATCTGACGGTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCCCTCCACCCTA
CACGCCTACCTCGACCCGGGTACCAATCTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTG
TTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGT
TTGTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTC
TGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTAAAGGTTGTCGAGTGAAGACG
AAAGGTTTCAATTAAGGCGCGCCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTG
TTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
AGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG

ES 2 743 913 T3

CTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG
GAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATC
CACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA
GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT
ACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCGCGCTT
ACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACG
CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA
AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCA
GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTC
TGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTACAAAAAG
GATCTTCACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAG
AGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCT
GTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG
AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGC
TCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT
GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAG
CTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT
GATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGA
AGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT
GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGC
GCCACATAGCAGAACTTAAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC
CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACT
GATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAA
ATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTT
TTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATG
TATTTAGAAAAATAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:55 pMPG-CR5

5

GTGACGATACCGTGCACTTAATTAAGCGCGCTCGACCAAATGATTTGCCCTCCCATATG
TCCTTCGAGTGAGAGACACAAAAAATCCAACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCT
TTATTAGCCAGAGGTCGAGGTCGGGGATCCGTTTAACTTGGACCTGGGAGTGGACAC

CTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGC
 CAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATG
 CCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCA
 CCTCGACCATCCGCCGTCTCAAGACCGCCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCC
 GCCAGAAACAACCCCGACCGCCACCCGCTGCCGCCCGCCACGGTGCTCAGCCTACCTT
 GCGACTGTGACTGGTTAGACGCCTTCTCGAGAGGTTTTCCGATCCGGTGCATGCGGAC
 TCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGTTTTCCGATCCAA
 GAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGCTGGCCCT
 CGCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGACCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCAGGTGTCTT
 CTATGGAGGTCAAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACG
 AGCTCTGCTTATATAGGCCTCCACCGTACACGCCCTACCTCGACCCGGGTACCAATCTT
 ATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTT
 GTTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTG
 TTTGTTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGT
 CTGTTTGTAAAGGTTGTGAGTGAAGACGAAAGGTTAATTAAGGCGCGCCGTCGACTA
 GCTTGGCAGCCAGAAATCCGCGCGGTGGTTTTTGGGGTTCGGGGTGTGGCAGCC
 ACAGACGCCCGGTGTTCTGTGTCGCGCCAGTACATGCGGTCCATGCCAGGCCATCCAA
 AAACCATGGGTCTGTCTGCTCAGTCCAGTCGTGGACCAGACCCACGCAACGCCCAAAA
 TAATAACCCCCACGAACCATAAACCATTCCCCATGGGGACCCCGTCCCTAACCCACGG
 GGCCAGTGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTT
 CACCCGAACCTGGGGGGTGGGGTGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCC
 AATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTT
 ATGAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGC
 GGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCCTATT
 CTTTGGCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTGGTTTTCCACTATCGGCGAGTACTTCTACA
 CAGCCATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACGCCCGACAGTCC
 CGGCTCCGGATCGGACGATTGCGTGCATCGACCCTGCGCCCAAGCTGCATCATCGAA
 ATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATACGCC
 GGAGCCGCGGGGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCGGTCTGCTG
 CTCCATAAAGCCAACCACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAAT
 CCCCGAACATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCATTGTCCGTCAGG
 ACATTGTTGGAGCCGAAATCCGCGTGCACGAGGTGCCGGACTTCGGGGCAGTCCCTCGG
 CCCAAAGCATCAGCTCATCGAGAGCCTGCGCGACGGACGCACTGACGGTGTCTGTCAT
 CACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATG
 TAGTGTATTGACCGATTCTTGGCGTCCGAATGGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGA
 TCGGCCGACGATCGCATCCATGGCCTCCGCGACCGGCTGCAGAACAGCGGGCAGTT

CGGTTTCAGGCAGGTCTTGCAACGTGACACCCTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGT
 CAGGCTCTCGCTGAATTCCCCAATGTCAAGCACTTCCGGAATCGGGAGCGCGCCGAT
 GCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACCATCGGCGCAGCTATTTACCCGC
 AGGACATATCCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACGAGATTCTTCGCCCTCCGA
 GAGCTGCATCAGGTCGGAGACGCTGTGCAACTTTTCGATCAGAACTTCTCGACAGACG
 TCGCGGTGAGTTCAGGCTTTTTCATATCTCATTGCCCGGGATCTGCGGCACGCTGTTGA
 CGCTGTTAAGCGGGTCGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTTCGAGGCCACACGCGTCACCTT
 AATATGCGAAGTGGACCTGGGACCGCGCCGCCCGACTGCATCTGCGTGTTTCAATTC
 GCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGTGCATCATAGAATAAAGACATGCAAATA
 TATTTCTTCCGGGGACACCCGCCAGCAAACCGGAGCAACGGGCCACGGGGATGAAGCAG
 GGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGG
 ATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCA
 GGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTC
 GCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTACGCGGATTTATGC
 CGCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTT
 GTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTGCAGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGG
 AAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTACCACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCT
 TGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCC
 ATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
 GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAA
 GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
 CTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
 TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTG
 TAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCT
 GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCA
 CTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
 AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC
 GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACA
 AACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAA
 AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
 ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTT
 AAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTT
 ACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAG
 TTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
 AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAA
 CCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
 CAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGC
 AACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTC
 ATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAA

ES 2 743 913 T3

AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTAT
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCT
TTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGA
GTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTC
ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG
GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG
GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCA
TGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCAT
GTTTGACAGCTTATCTCTAGCAGATCCGGAATCCCCCTCCCAATTTAAATGAGGACCTA
ACCTGTGAAATCTACTGATGTGGGAGGCTGTAACGTACAAACAGAGGTTATTGGAATA
ACTAGCATGCTTAACCTTCATGCAGGGTCACAAAAAGTCATGACGATGGTGGAGGAAA
ACCTATTCAAGGCAGTAATTTCCACTTCTTTGCTGTTGGTGGAGACCCCTTGAAATGCA
GGGAGTGCTAATGAATTACAGGACAAAGTACCCAGATGGTACTATAACCCCTAAAAACCC
AACAGCCCAGTCCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTTGGACAAAAACAATGC
TTATCCAGTTGAGTGCTGGGTTCTGATCCTAGTAGAAATGAAAATACTAGGTATTTTGG
GACTTTACAGGAGGGGAAAATGTTCCCCAGTACTTCATGTGACCAACACAGCTACCA
CAGTGTGCTAGATGAACAGGGTGTGGGGCCTCTTTGTAAAGCTGATAGCCTGTATGTTT
CAGCTGCTGATATTTGTGGCCTGTTTACTAACAGCTCTGGAACACAACAGTGAGAGGC
CTTGCAAGATATTTAAGATCCGCCTGAGAAAAGATCTGTAAAGAATCCTTACCTAATTT
CCTTTTTGCTAAGTGACCTTATAAACAGGAGAACCCAGAGAGTGGATGGGCAGCCTATG
TATGGTATGGAATCCCAGGTAGAAGAGTTAGGGTGTGTTGATGGCACAGAAAGACTTCC
AGGGGACCCAGATATGATAAGATATATTGACAAACAGGGACAATTGCAAACCAAATGCT
TTAAACAGGTGCTTTTATTGTACATATACATTTAATAAATGCTGCTTTTGTATAAGCCACTT
TTAAGCTTGTGTTATTTTGGGGTGGTGTGTTTAGGCCTTTTAAACACTGAAAGCCTTTAC
ACAAATGCAACTCTTGACTATGGGGTCTGACCTTTGGGAATGTTGAGCAGGGGCTGAA
GTATCTGAGACTTGGGAAGAGCATTGTGATTGGGATTCAGTGCTTGATCCATGTCCAGA
GCTTTCAGTTTCTGAATCCTTCTTCTTGTAAATCAAGAATACATTTCCCATGCATATAT
TATATTTATCCTTGAAAAAGTATACATACTTATCTCAGAATCCAGCCTTTCCTTCCATTCA
ACAATTCTAGAAGTTAAAACCTGGGGTAGATGCTATTACAGAGGTAGAATGCTTCCTAAAC
CCAGAAATGGGGGATCTGC

SEQ ID NO.:56 – secuencia polipeptídica de CDR2 de la cadena pesada humanizada de 3A4
DINPYNGDTNYNQKFKG

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, capaz de unirse específicamente al antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1) y que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDRH1 expuesta en la SEQ ID NO.:5, la secuencia de aminoácidos de CDRH2 expuesta en la SEQ ID NO.:6 y la secuencia de aminoácidos de CDRH3 expuesta en la SEQ ID NO.:7 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDRL1 expuesta en la SEQ ID NO.:8, la secuencia de aminoácidos de CDRL2 expuesta en la SEQ ID NO.:9 y la secuencia de aminoácidos de CDRL3 expuesta en la SEQ ID NO.:10, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende regiones marco humanas y opcionalmente una o más retromutaciones en la región variable de la cadena ligera y/o región variable de la cadena pesada, en donde las una o más retromutaciones están en la región marco y corresponden a aminoácidos marco hallados en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO.:2 y/o en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO.:4 del anticuerpo de ratón parental.
2. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde las retromutaciones en la región variable de cadena pesada son Ile en la posición 2 y Lys en la posición 73.
3. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 2, que comprende retromutaciones adicionales en la región variable de la cadena pesada, en donde dichas retromutaciones adicionales son Ile en la posición 48, Ala en la posición 67, Leu en la posición 69 y Val en la posición 71.
4. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 3, que comprende retromutaciones adicionales en la región variable de la cadena pesada, en donde dichas retromutaciones adicionales son Lys en la posición 38 y Lys en la posición 66.
5. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las retromutaciones en la región variable de cadena ligera son Val en la posición 2 y Lys en la posición 45.
6. Un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo capaz de unirse específicamente al antígeno 1 asociado al riñón (KAAG1), en donde el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO.:35, SEQ ID NO.:36 o SEQ ID NO.:37 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31 o SEQ ID NO.:32.
7. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este está conjugado con un resto terapéutico, un agente citotóxico o un resto detectable.
8. Un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Una célula aislada que comprende:
- (a) un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado o del fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o del fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde cada ácido nucleico está en un vector separado o en el mismo vector; o
 - (b) el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Una composición o una composición farmacéutica que comprenden el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha composición comprende además un vehículo y en donde dicha composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un kit que comprende el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
13. Un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento, la detección o el diagnóstico del cáncer que comprende células que expresan KAAG1 o una

variante de KAAG1.

- 5 14. El anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo o composición o composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer renal, cáncer colorrectal, sarcoma, leucemia, cáncer cerebral, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón y cáncer de cabeza y cuello y/o en donde el cáncer es metastásico.
- 10 15. Un método de ADN recombinante para preparar el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar una célula aislada como se define en la parte (a) de la reivindicación 10 de modo que se produce el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

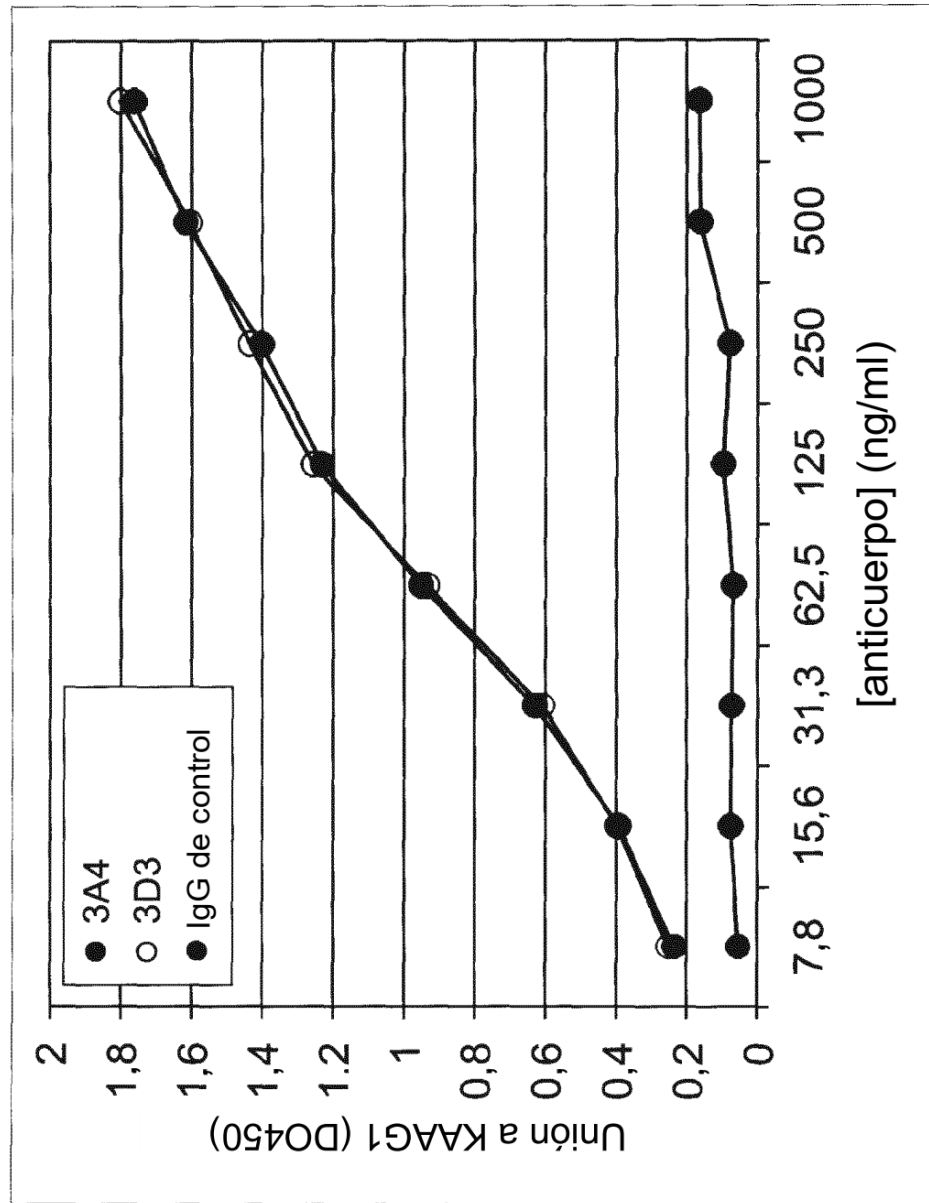


Figura 1

Figura 2

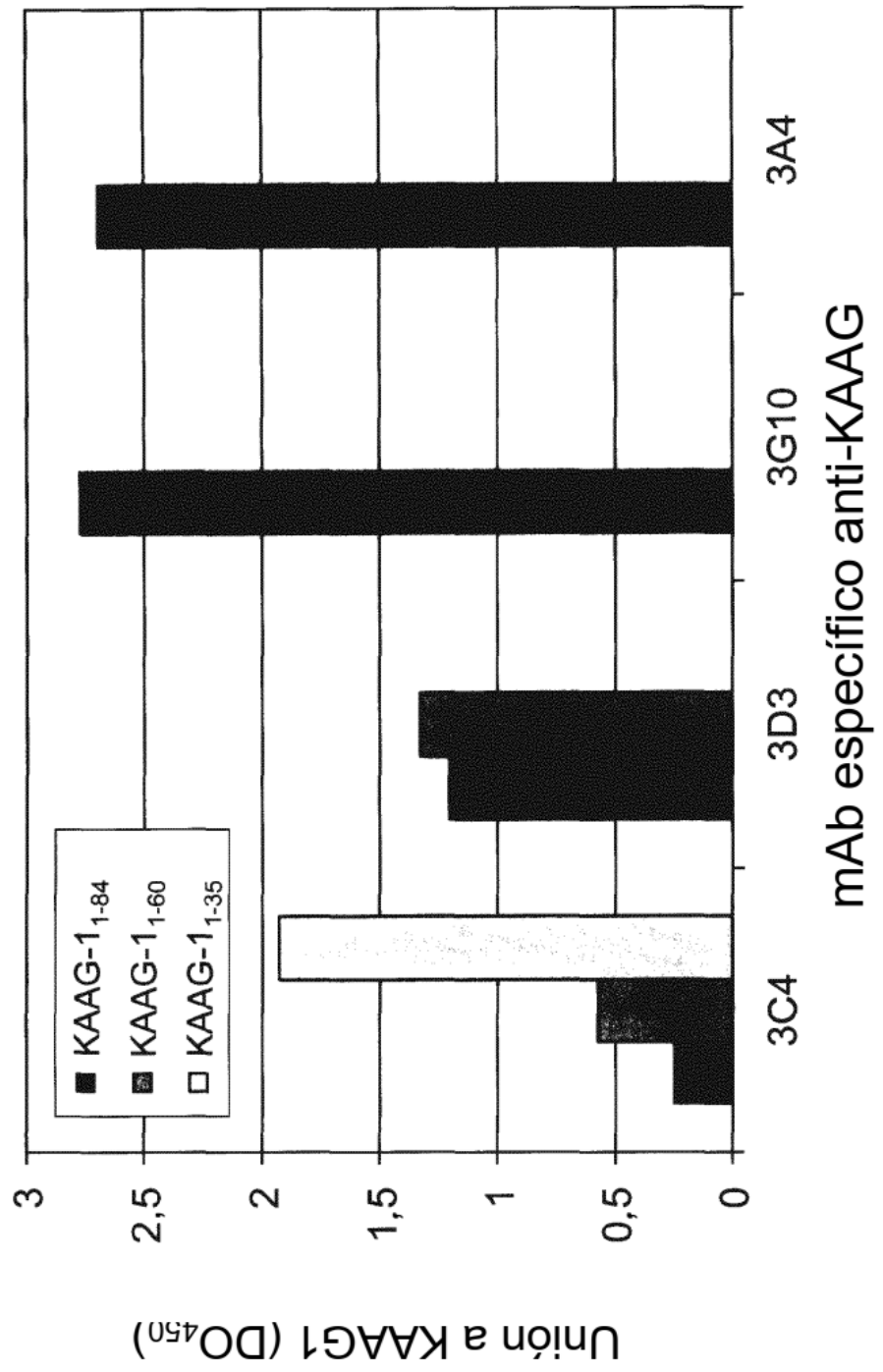


Figura 3A

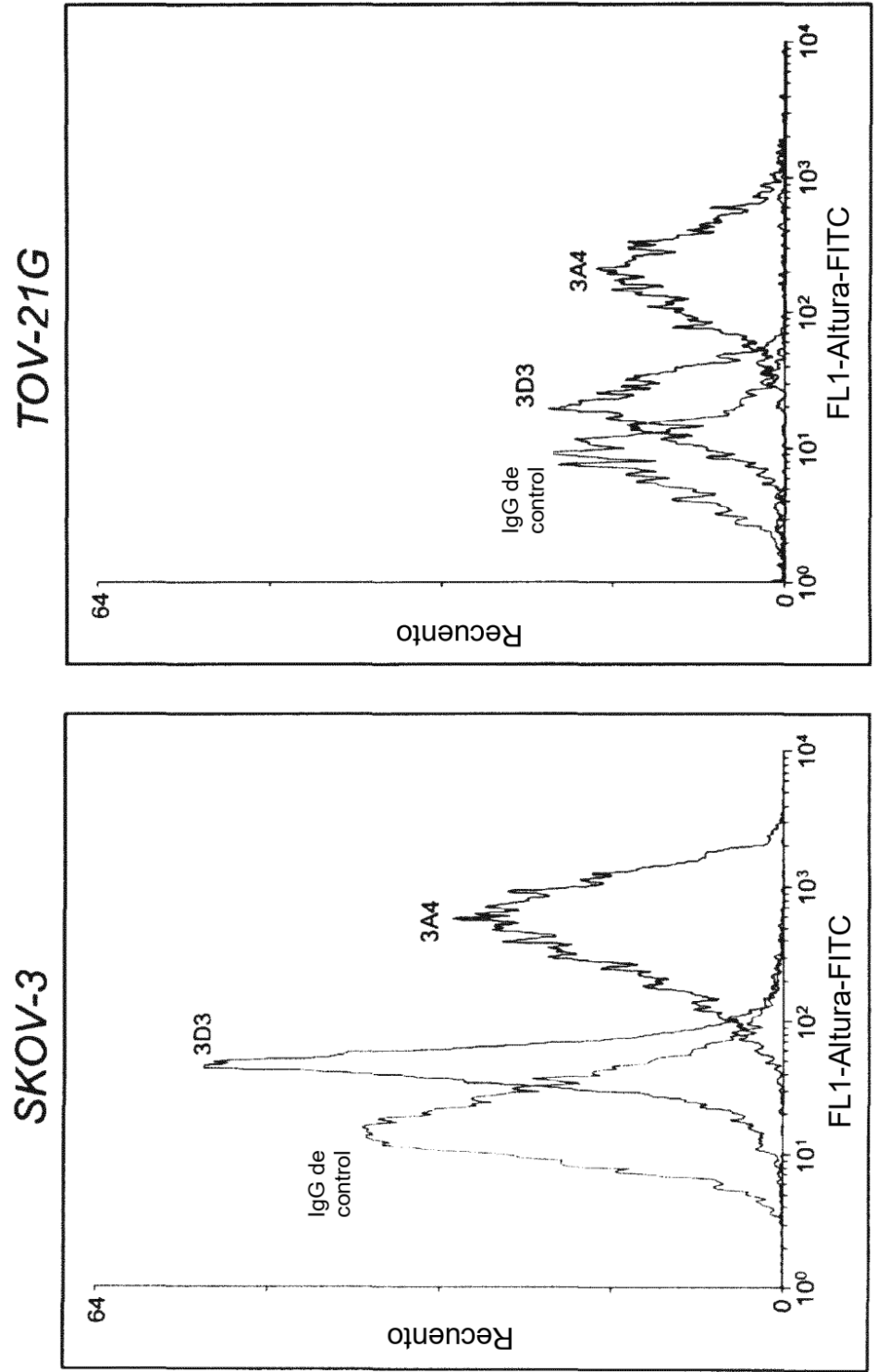
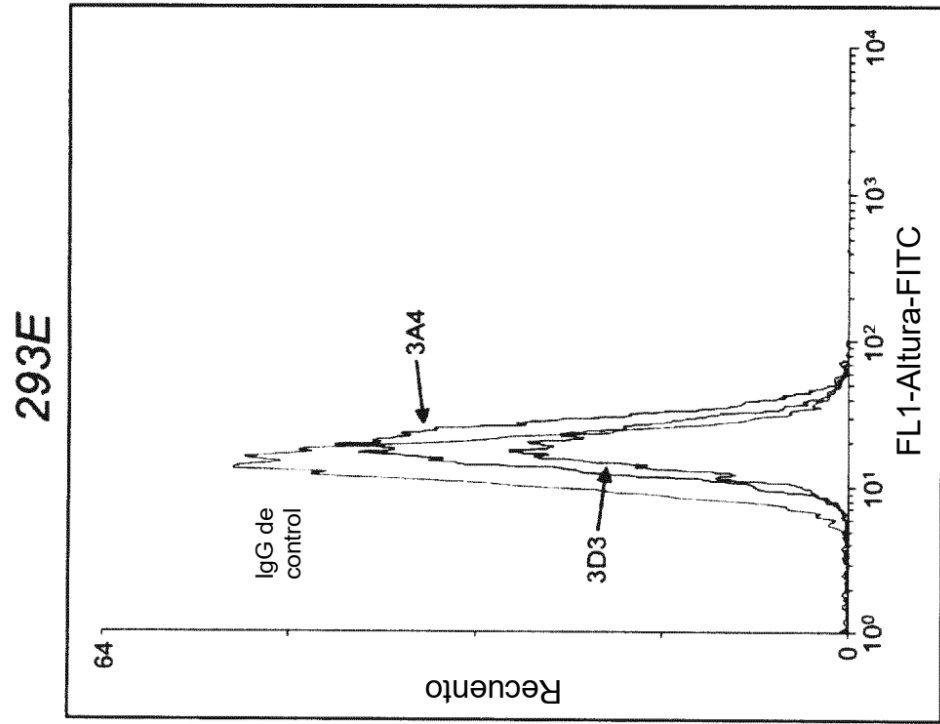


Figura 3B



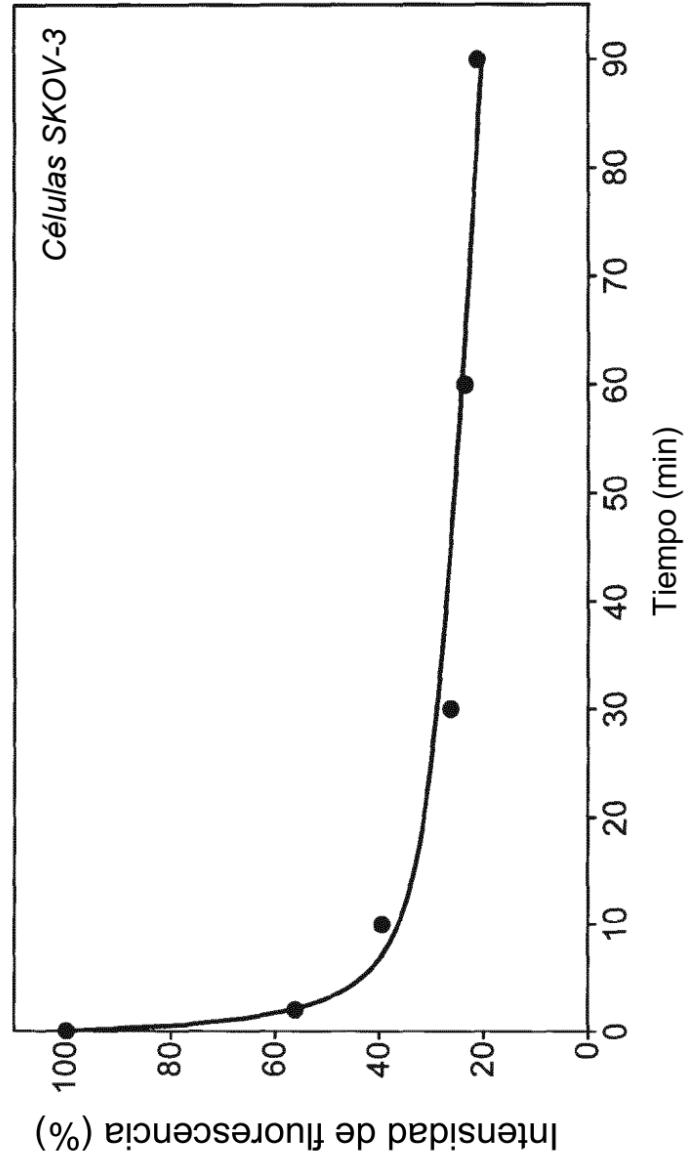


Figura 4

Figura 5A



Figura 5B

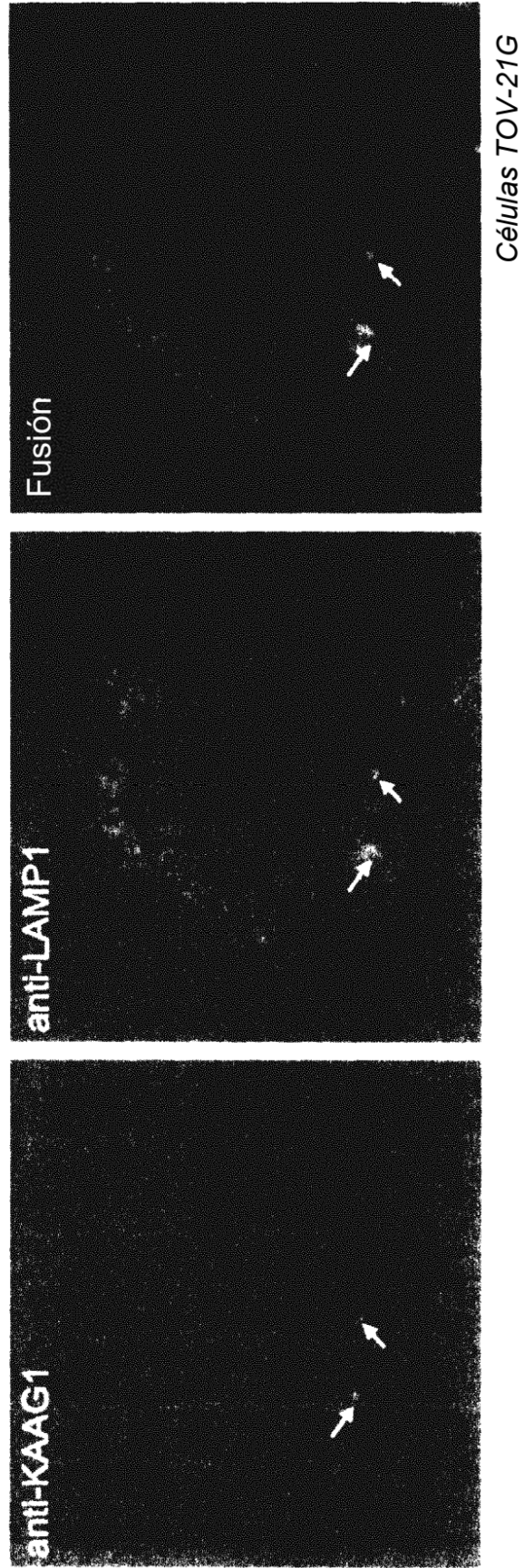


Figura 6A

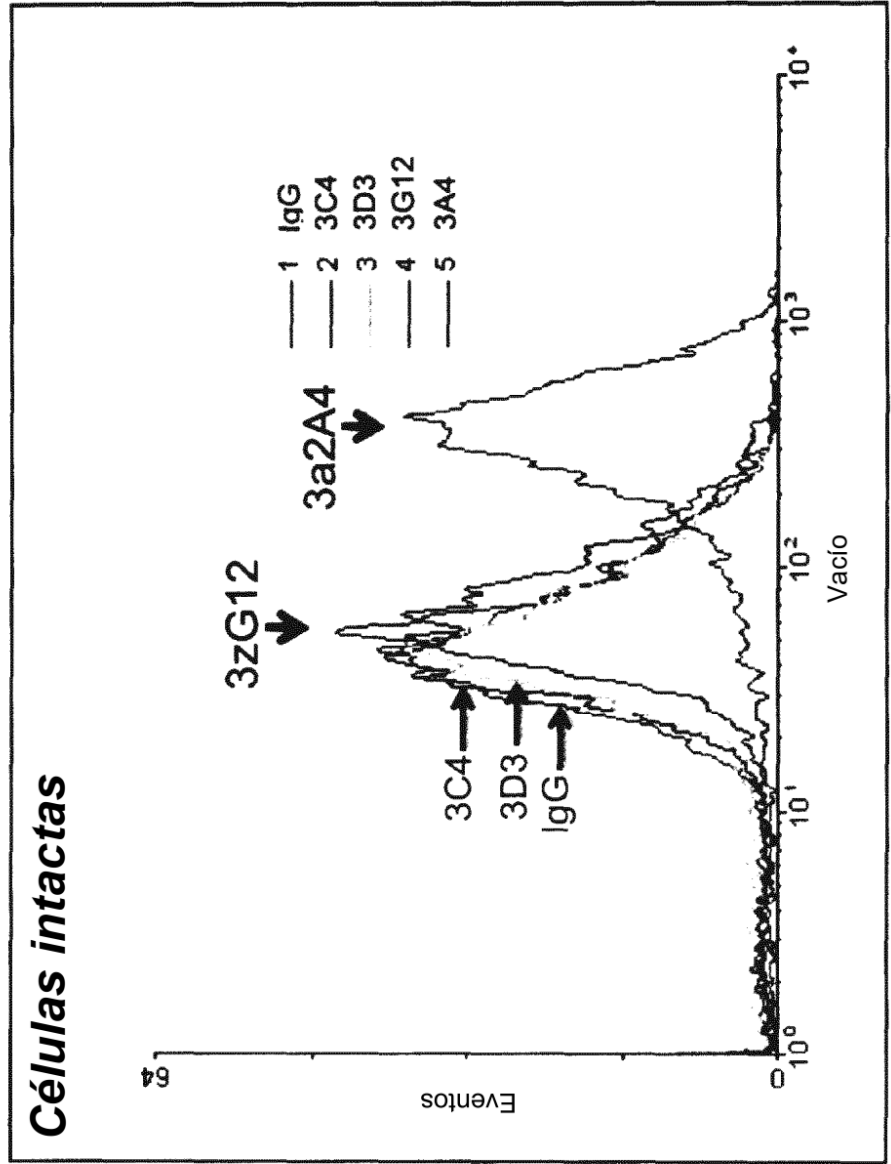


Figura 6B

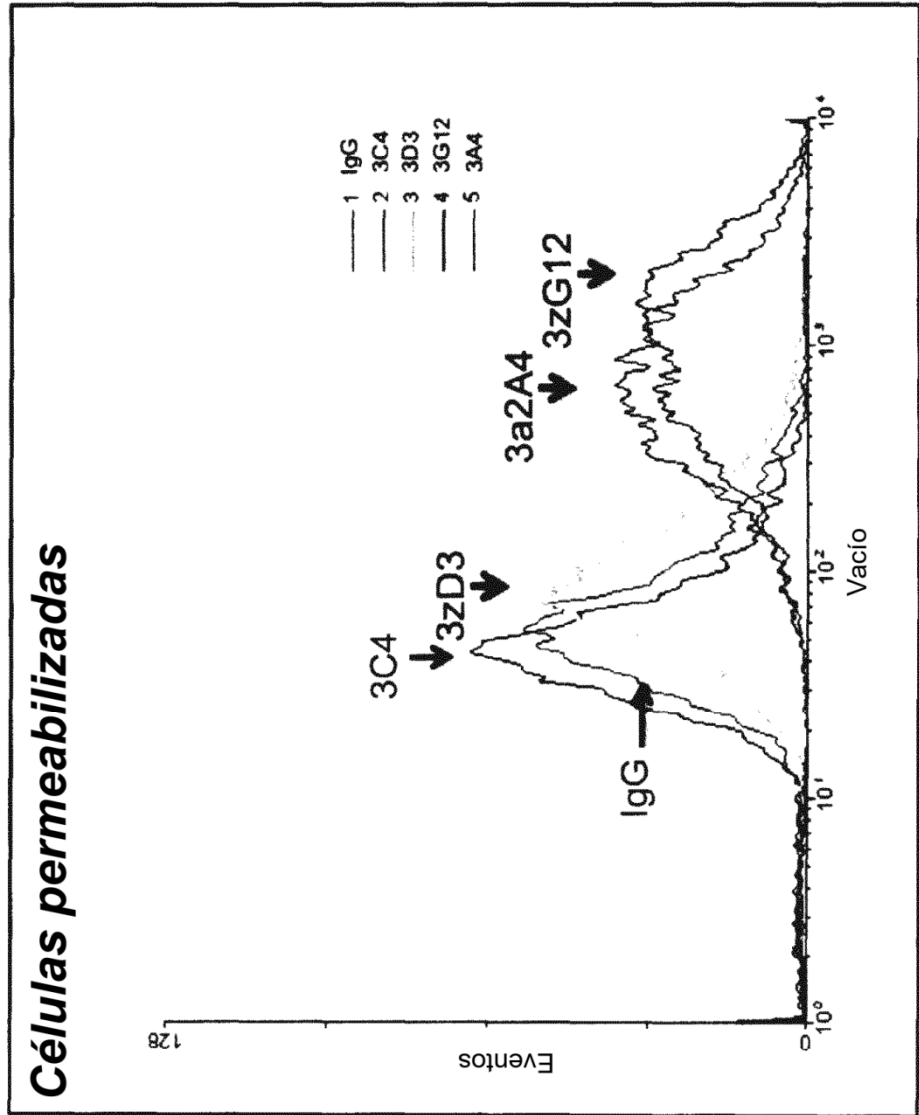
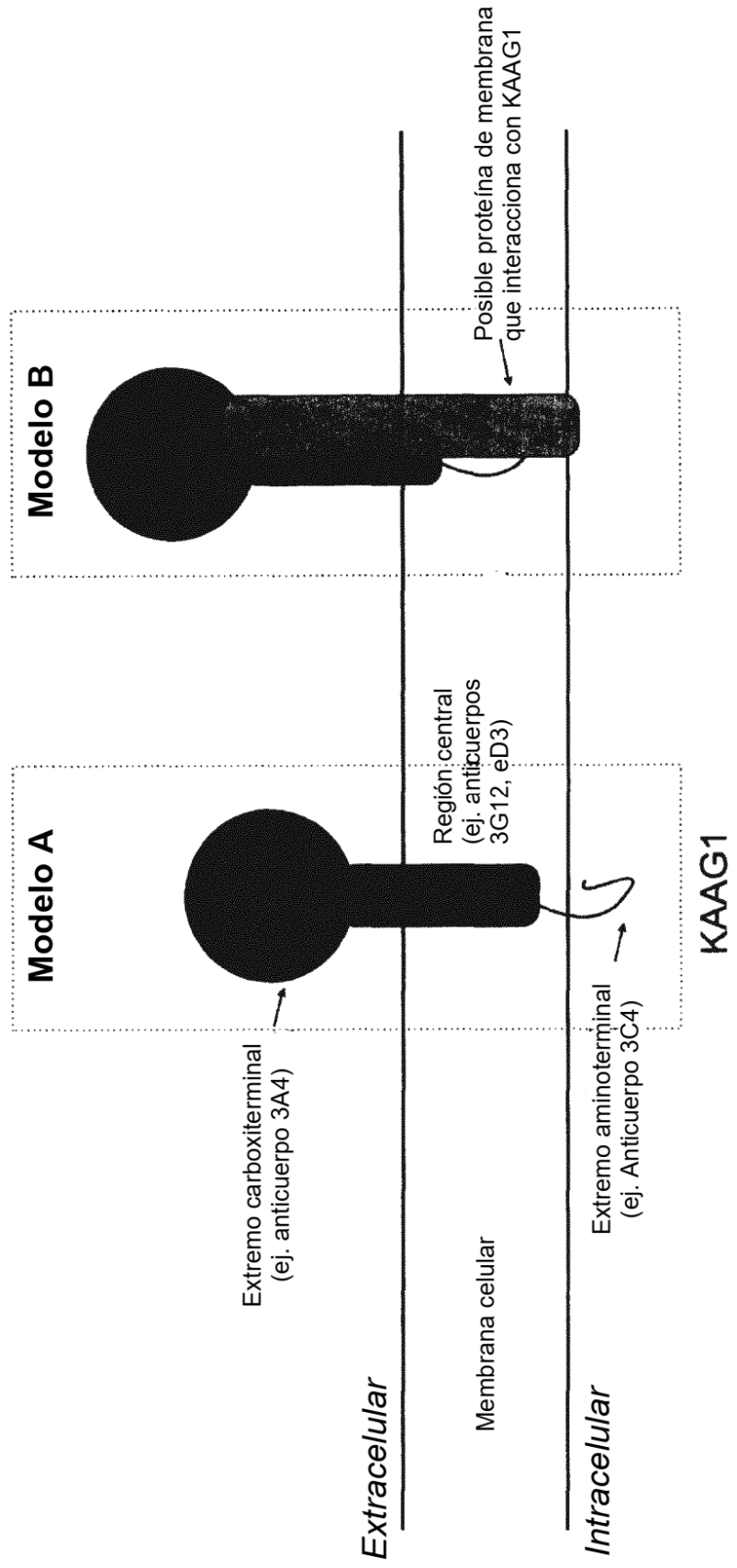


Figura 7



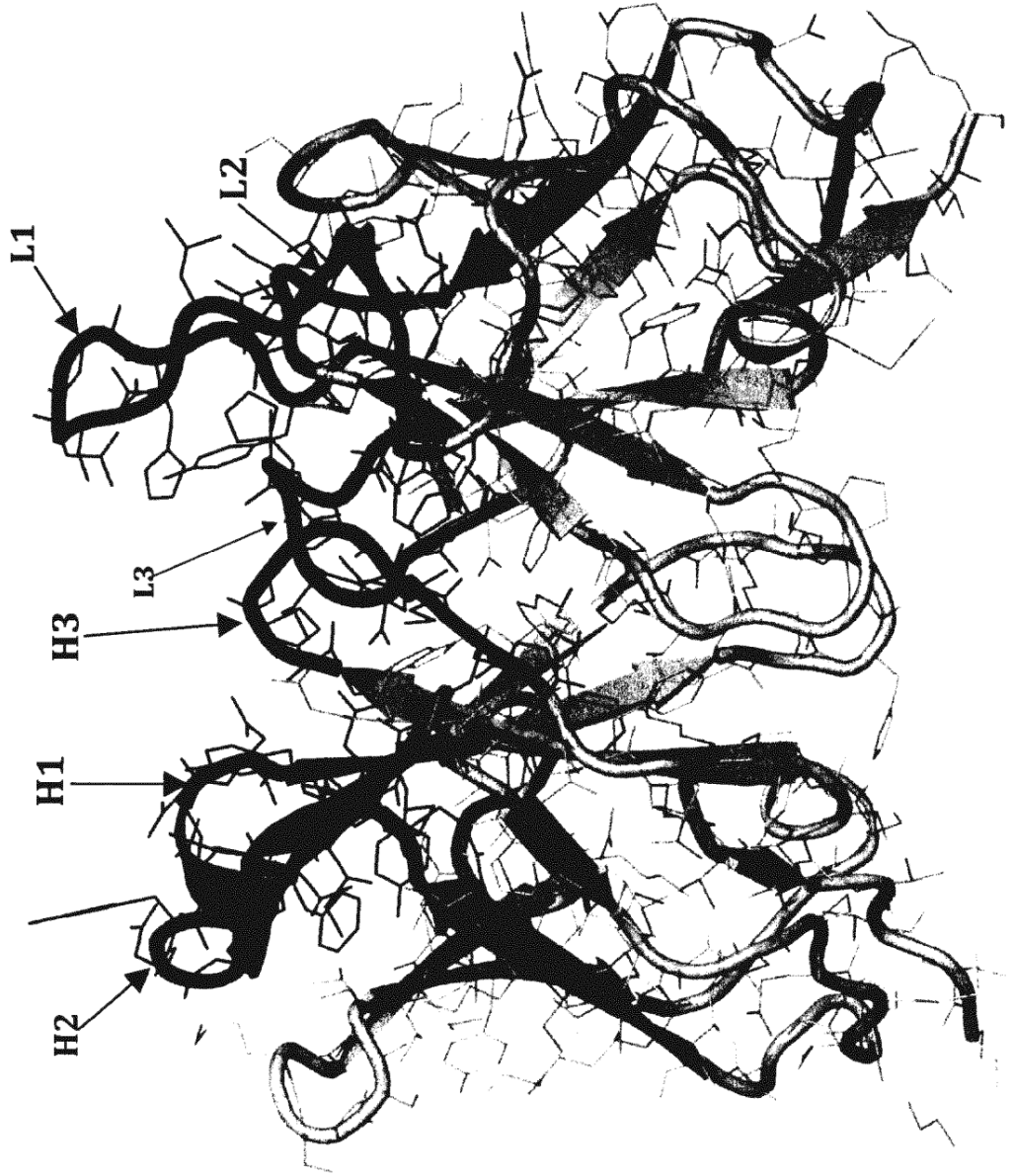


Figura 8

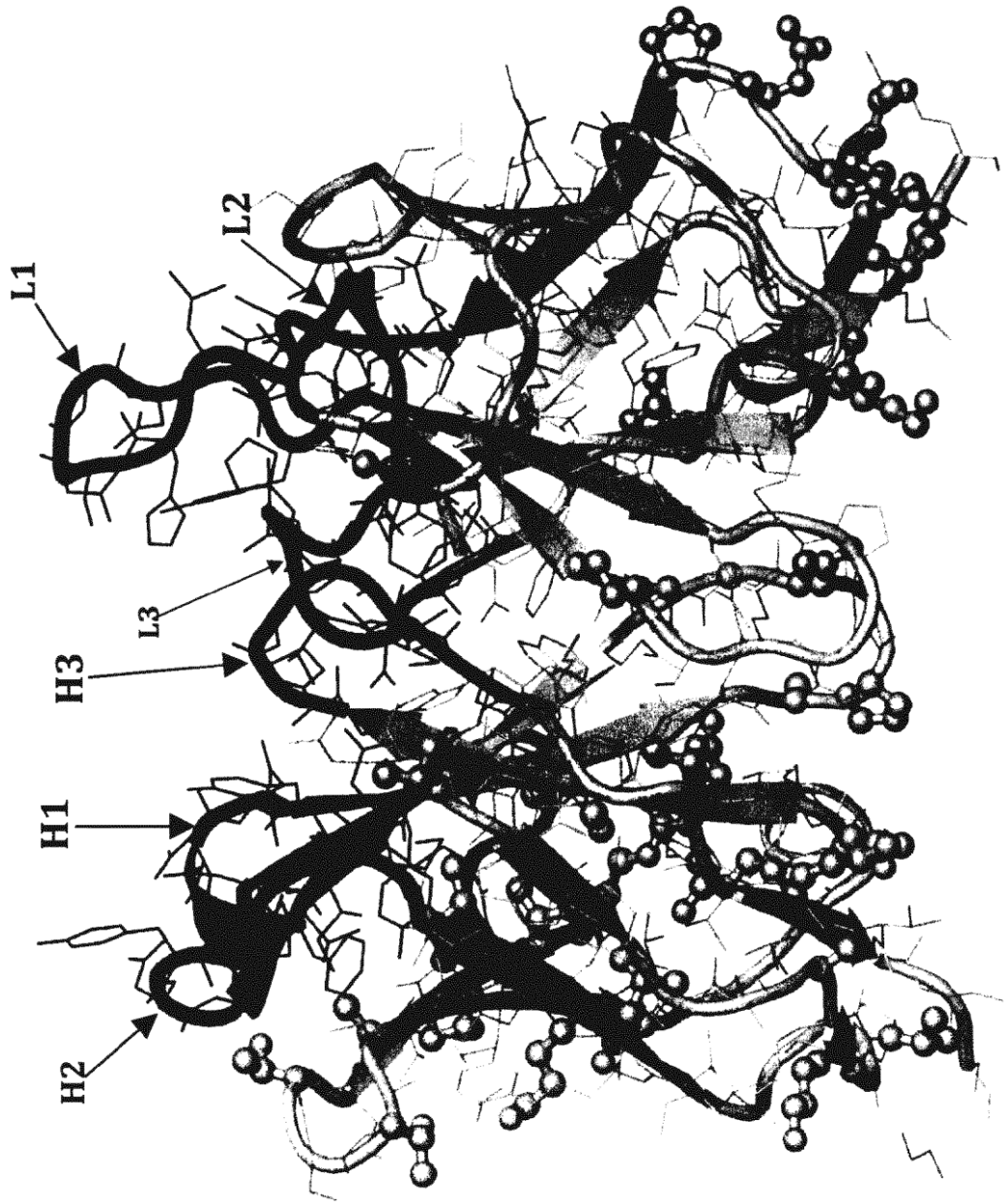


Figura 9a

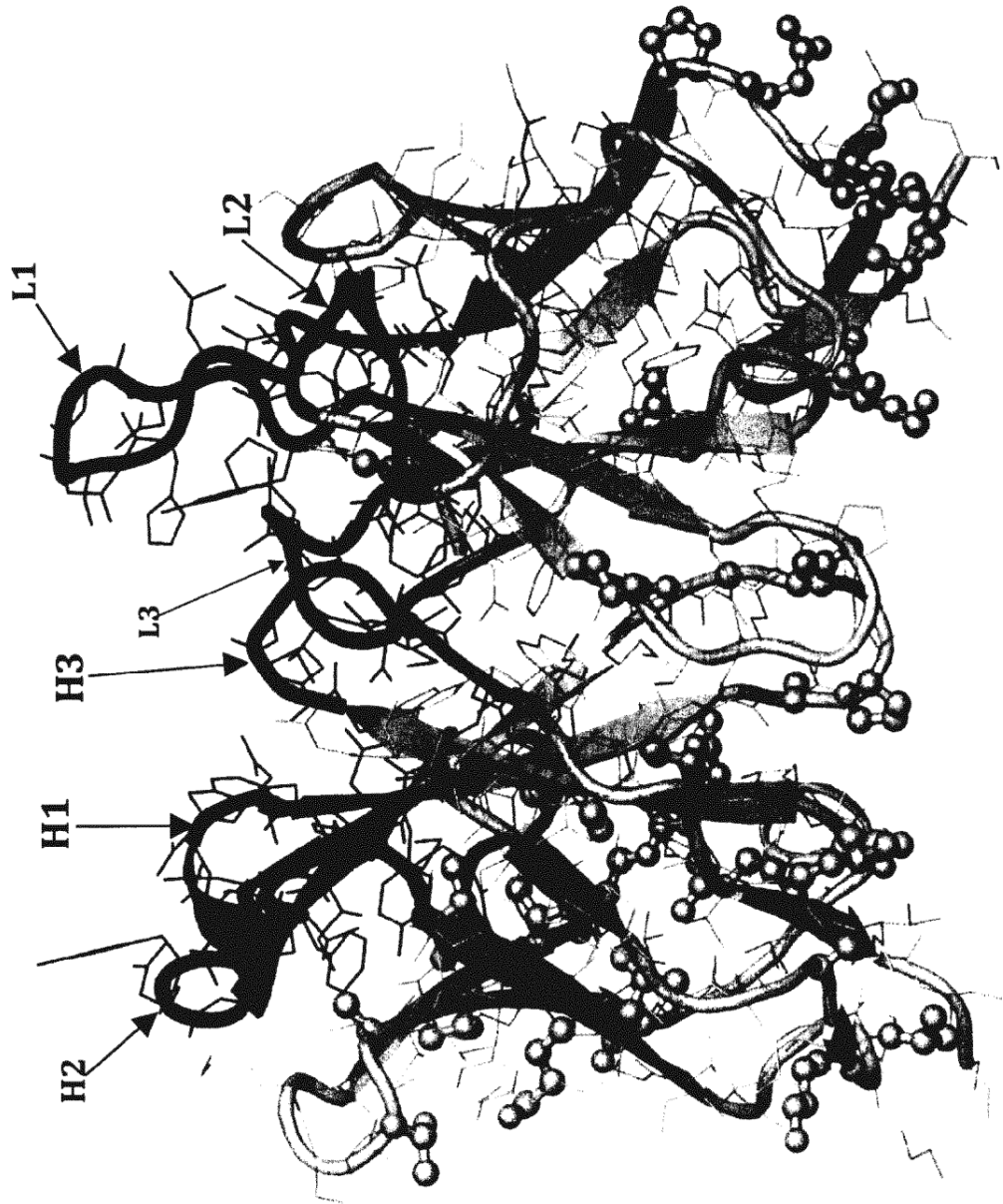


Figura 9b

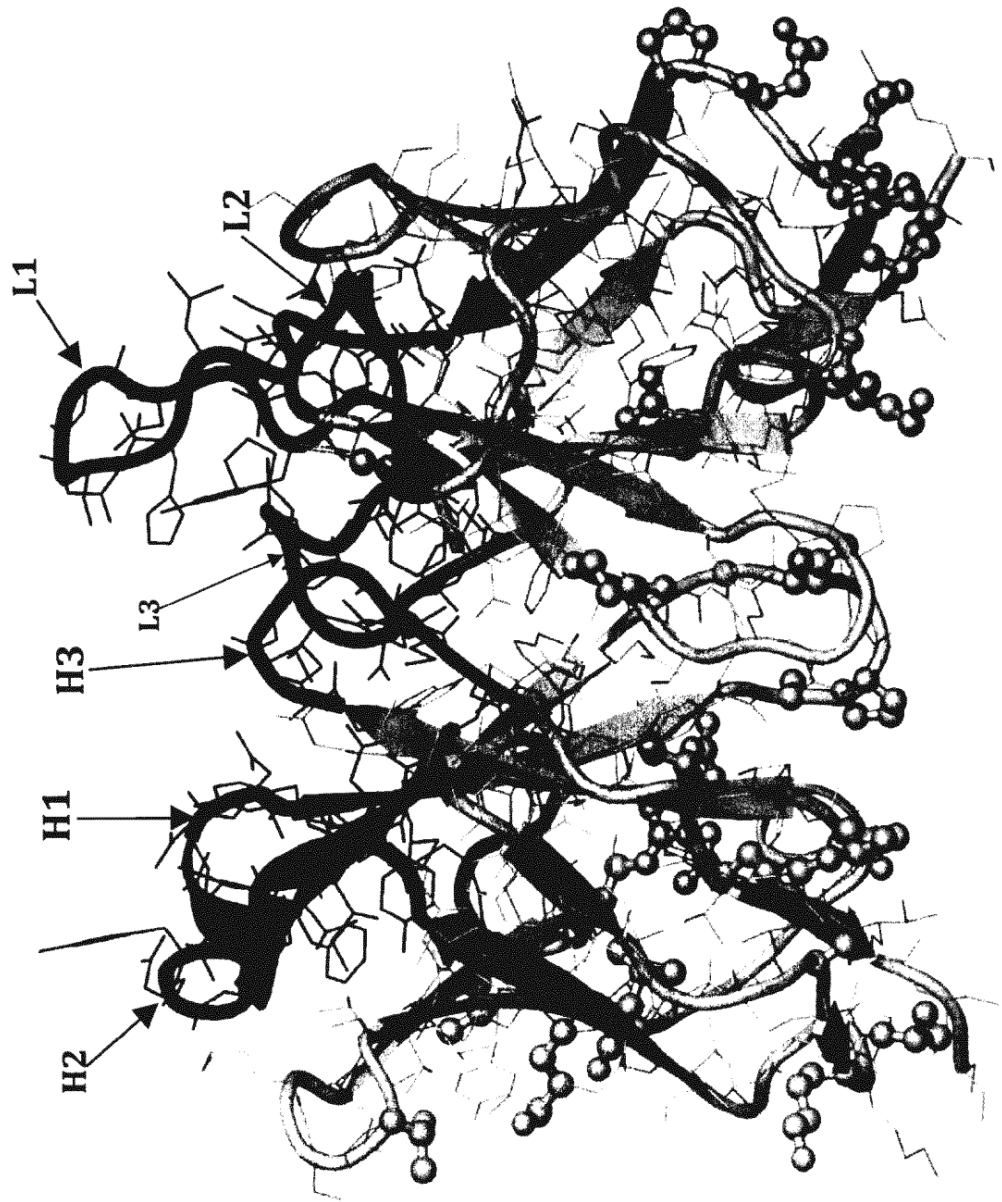


Figura 9c

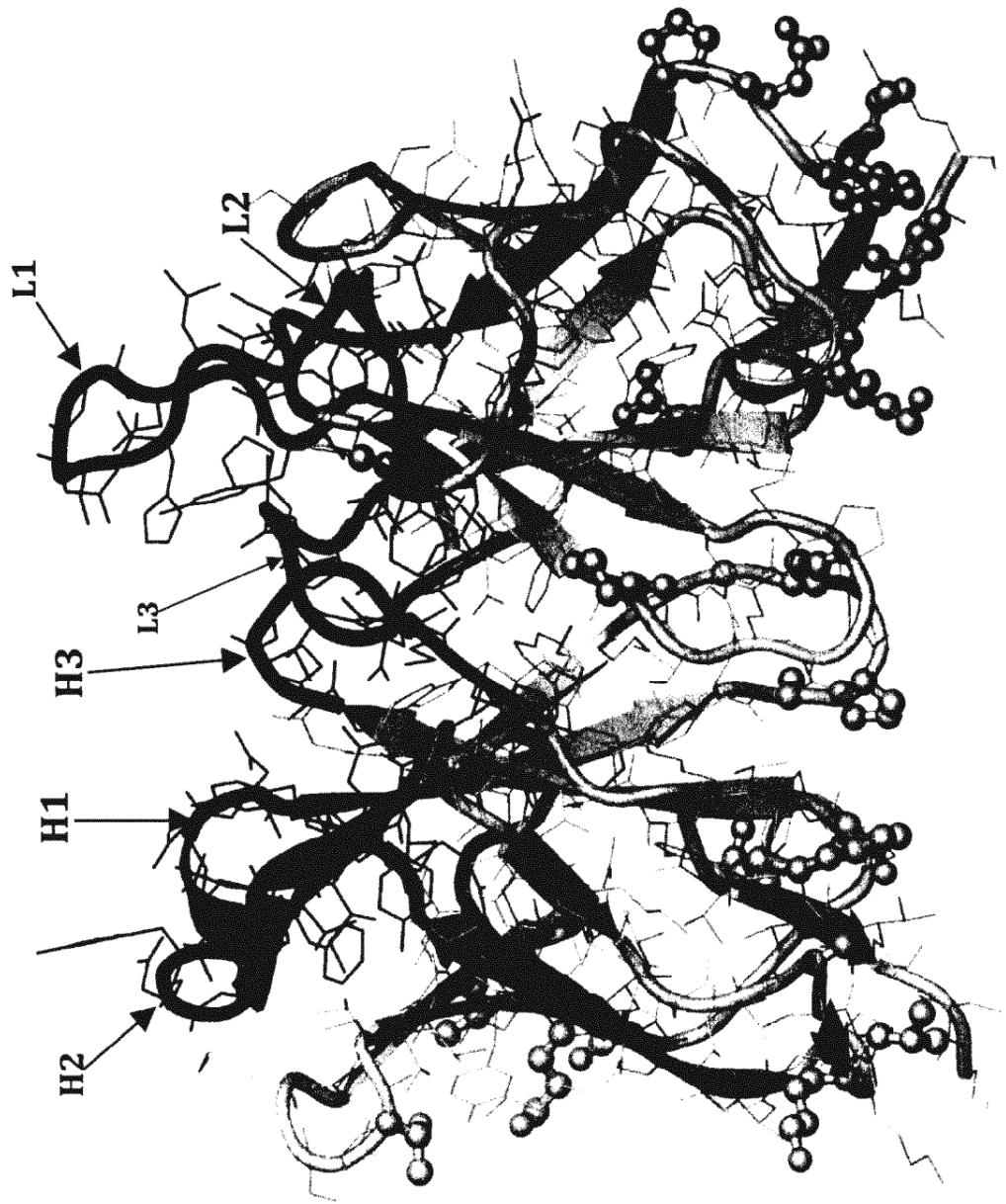


Figura 9d

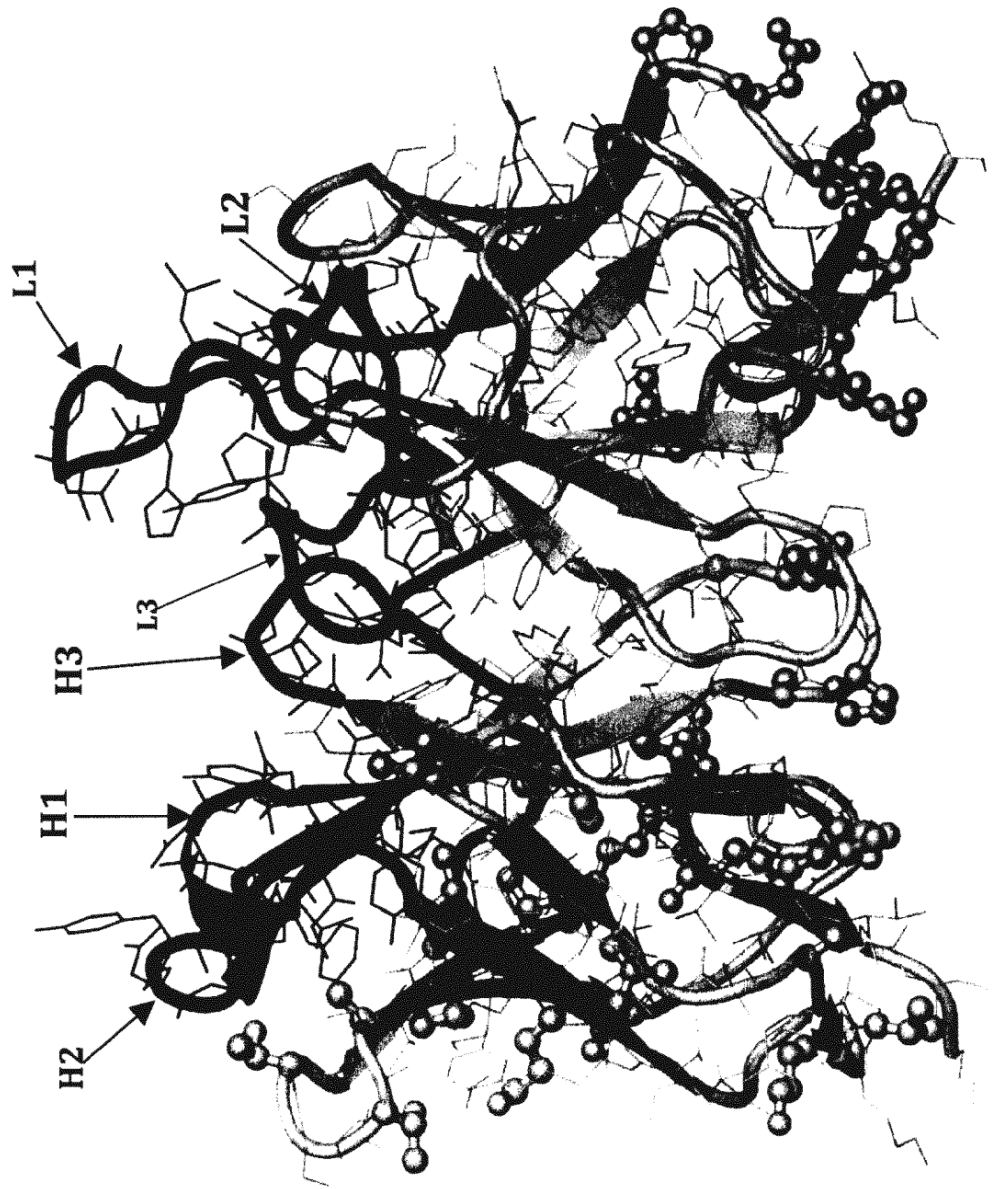


Figura 9e

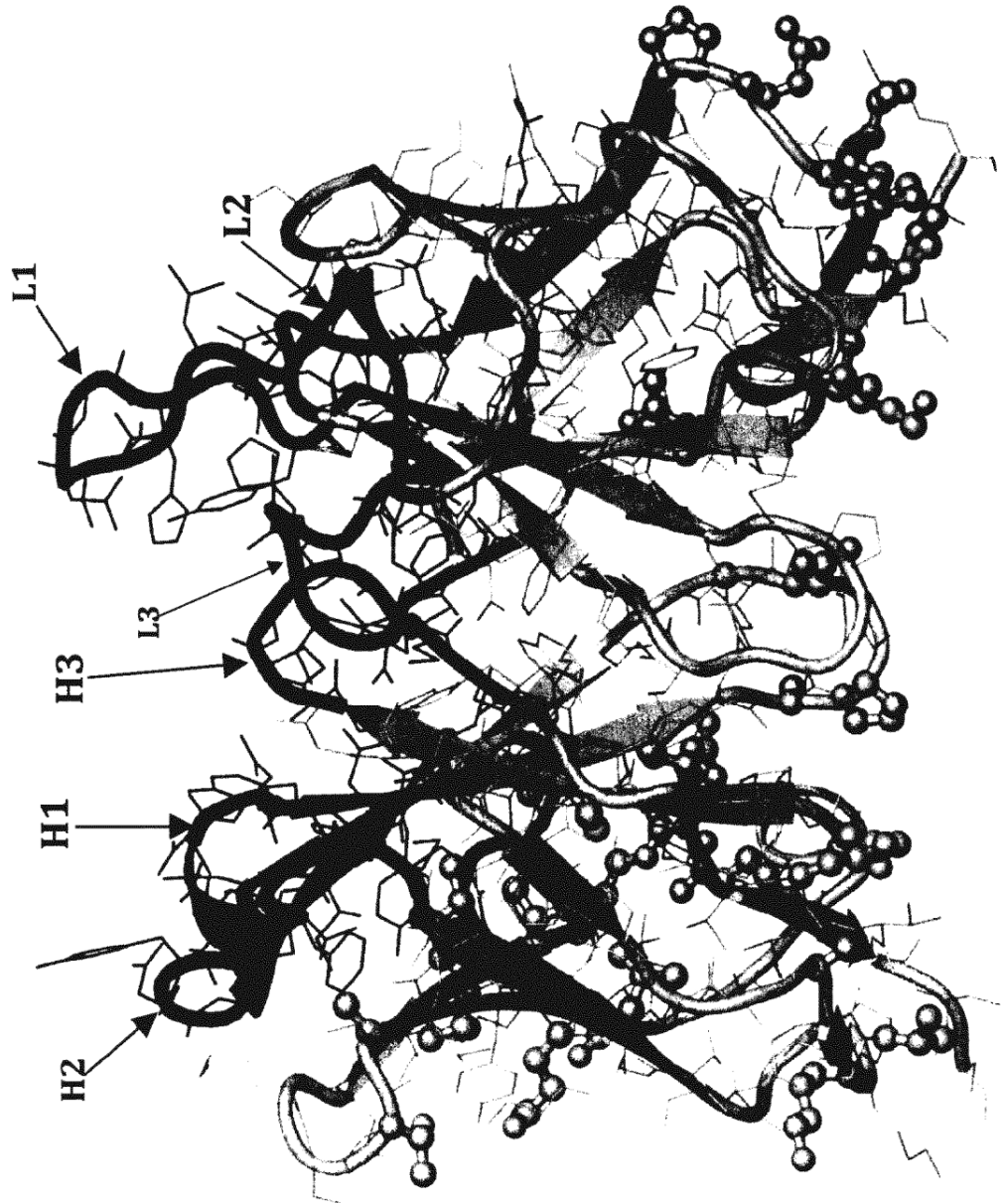


Figura 9f

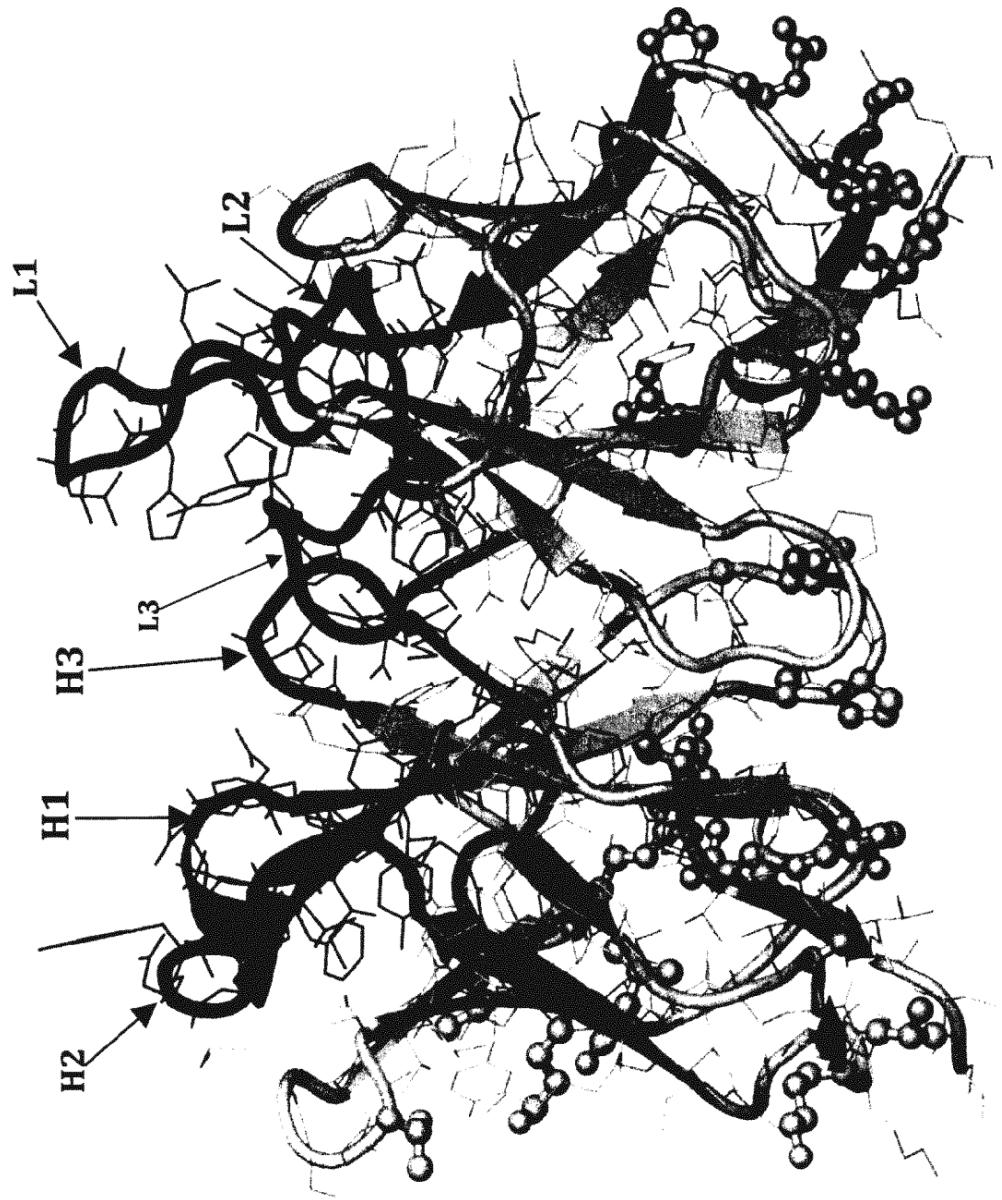


Figura 9g

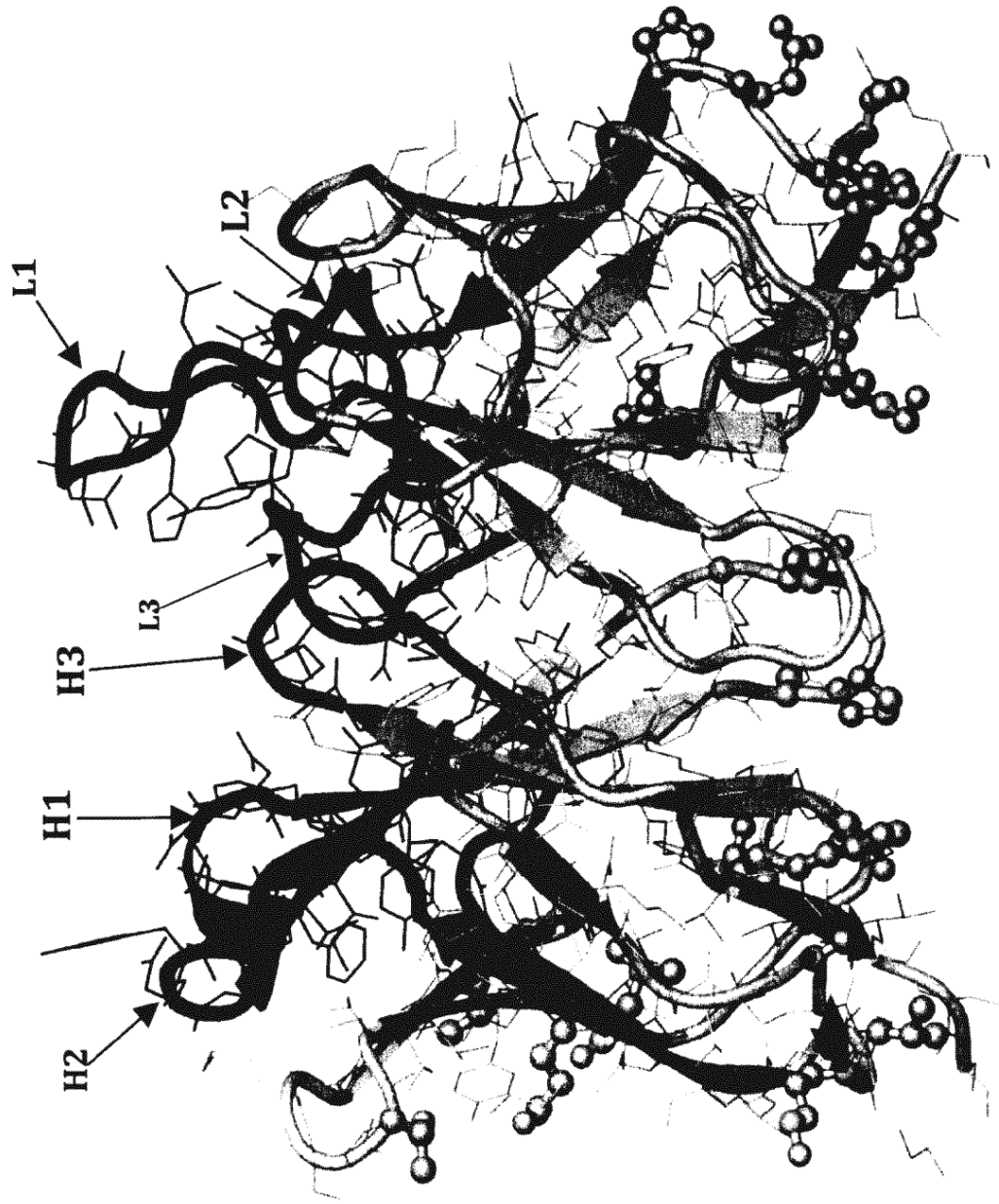


Figura 9h

Figura 11A

Alineamiento de la cadena ligera variable

```

VL de ratón          DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHNSGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRF 60
SEQ ID NO.33        DIVMTQTPLSLPVTPEPASPISCRSSQSLHNSGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRF 60
*:*****.*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
VL de ratón          SGVPRFRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGAGTRLELK 112
SEQ ID NO.33        SGVPRFRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIK 112
*:*****.*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figura 11B

Alineamiento de la cadena pesada variable

```

VL de ratón          QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFDDYMSWVKQSHGKSLIEWIGDINPYNGDTNY 60
SEQ ID NO.38        QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY 60
*:*****.*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
VL de ratón          NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSS 116
SEQ ID NO.38        NQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTSLVTVSS 116
*:*****.*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```


Figura 12A

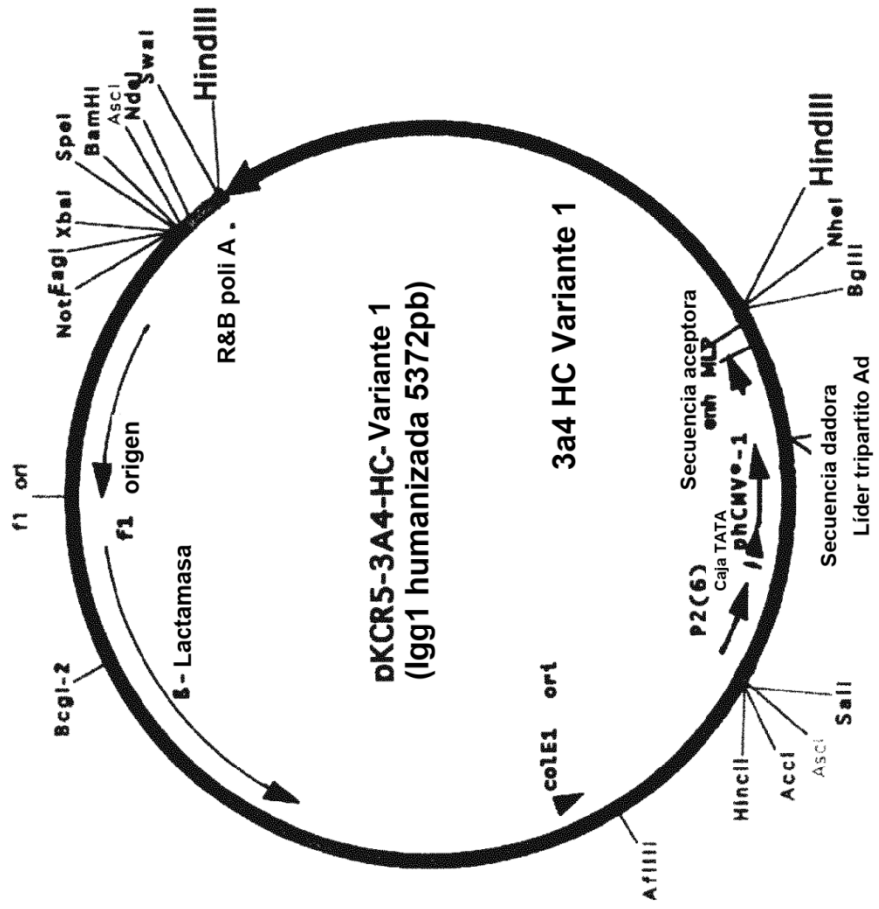
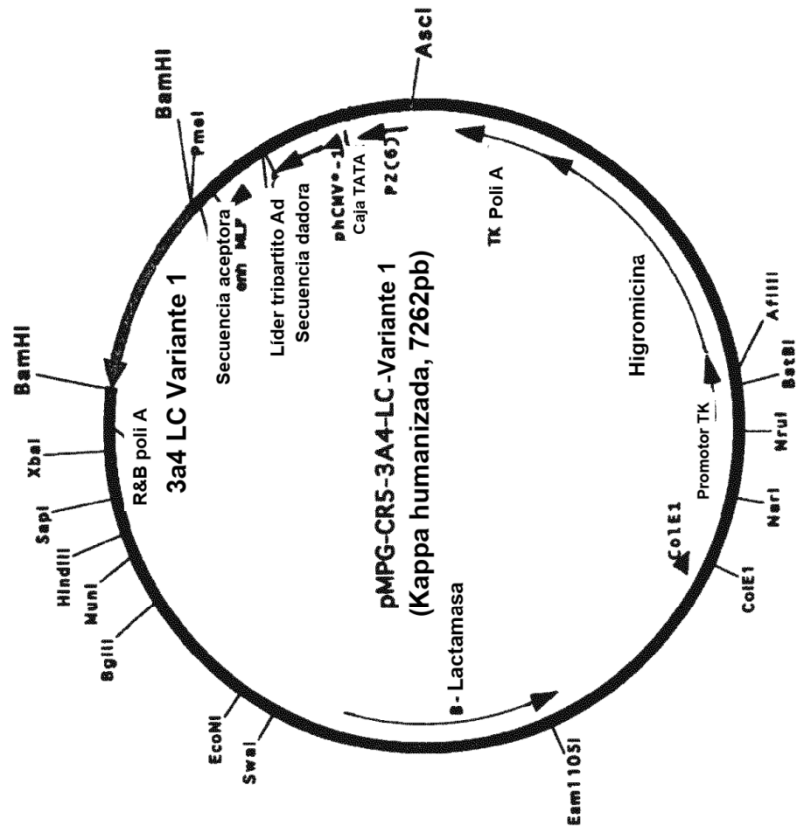


Figura 12b



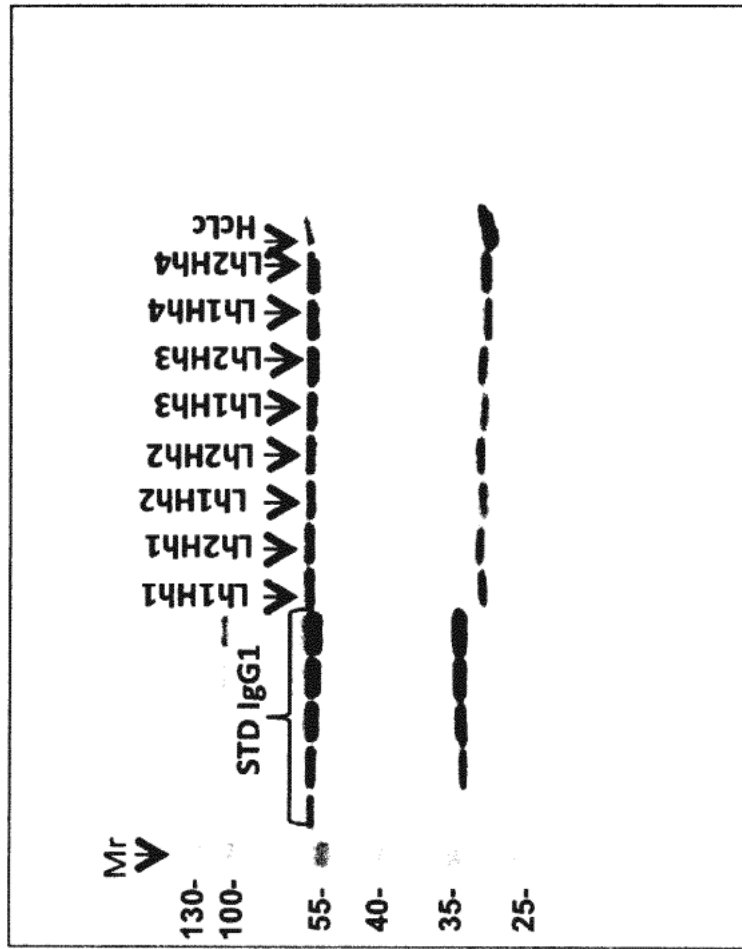


Figura 13

Figura 14

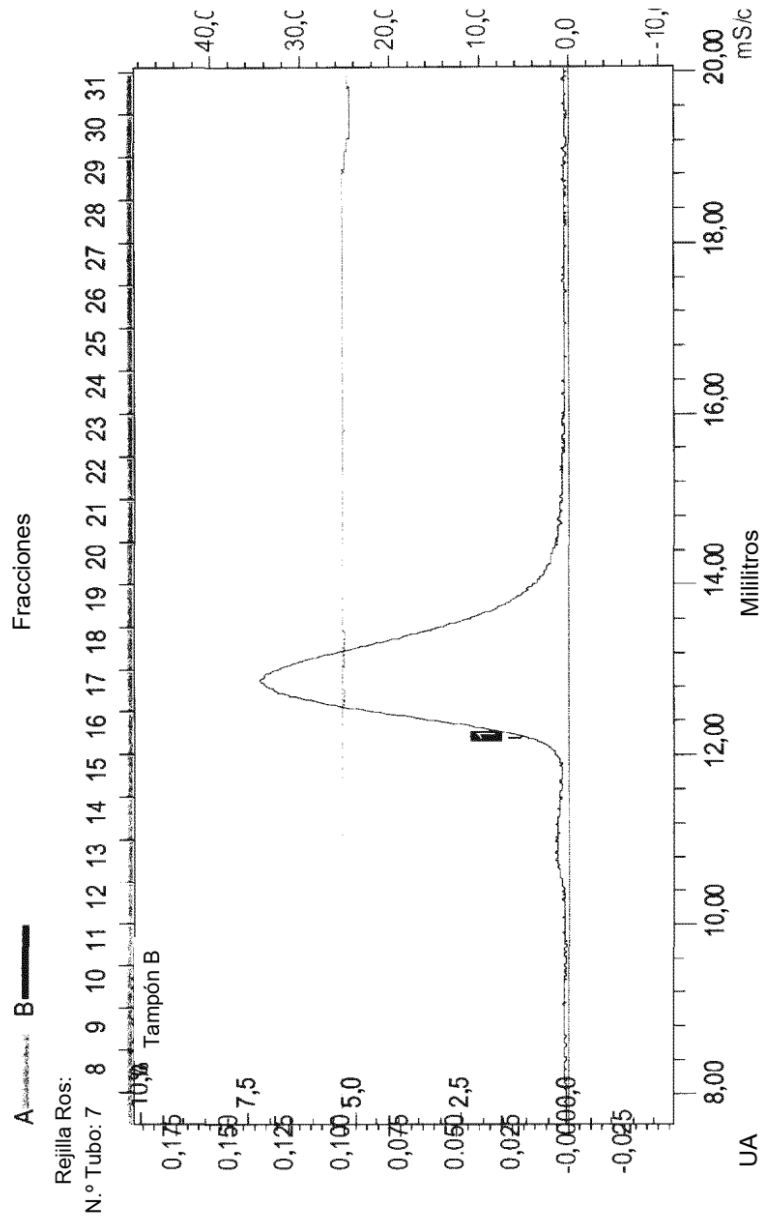


Figura 15

Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (nM)	Factor de dif.
LcHc	7,72 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁻⁴	0,016	-
Lh1Hh1	6,93 x 10 ⁶	3,28 x 10 ⁻³	0,474	29,6
Lh2Hh1	6,97 x 10 ⁶	2,37 x 10 ⁻³	0,341	21,3
Lh1Hh2	5,65 x 10 ⁶	1,19 x 10 ⁻³	0,211	13,2
Lh2Hh2	7,40 x 10 ⁶	1,81 x 10 ⁻³	0,245	15,3
Lh1Hh3	6,46 x 10 ⁶	9,60 x 10 ⁻⁴	0,149	9,3
Lh2Hh3	4,46 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁻³	0,228	14,3
Lh1Hh4	5,14 x 10 ⁶	7,64 x 10 ⁻⁴	0,149	9,3
Lh2Hh4	4,57 x 10 ⁶	4,70 x 10 ⁻⁴	0,103	6,4

Figura 16A

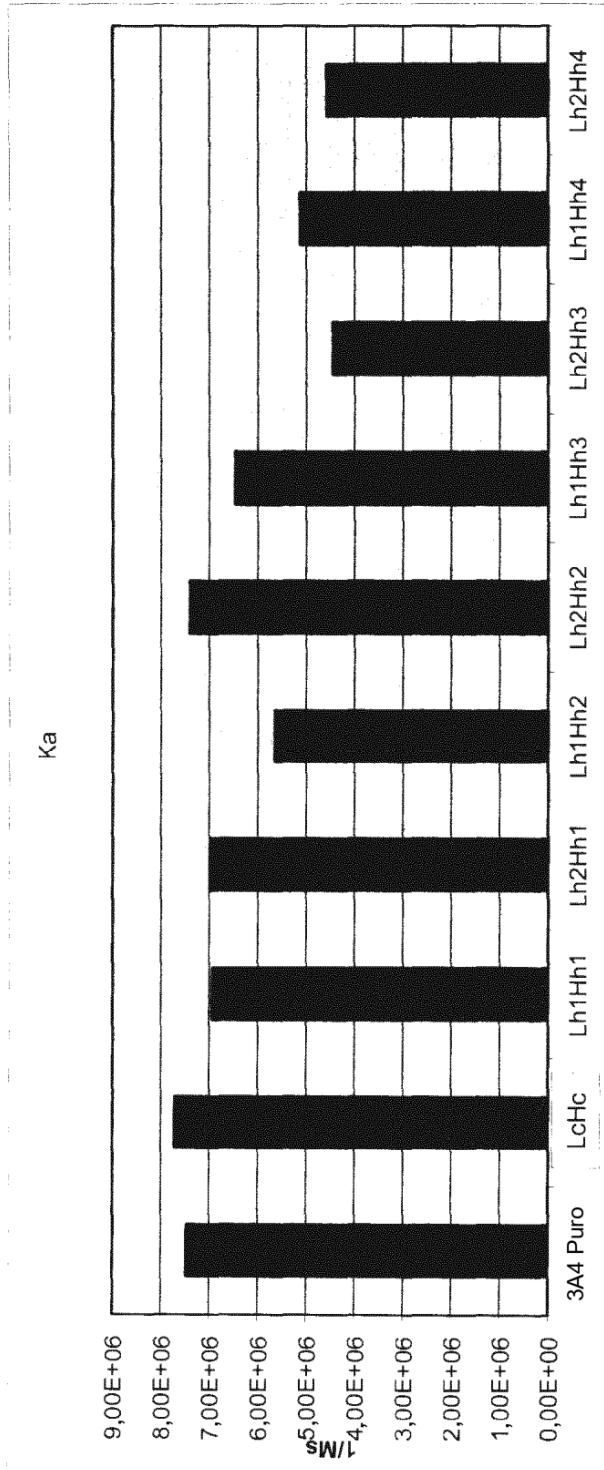


Figura 16B

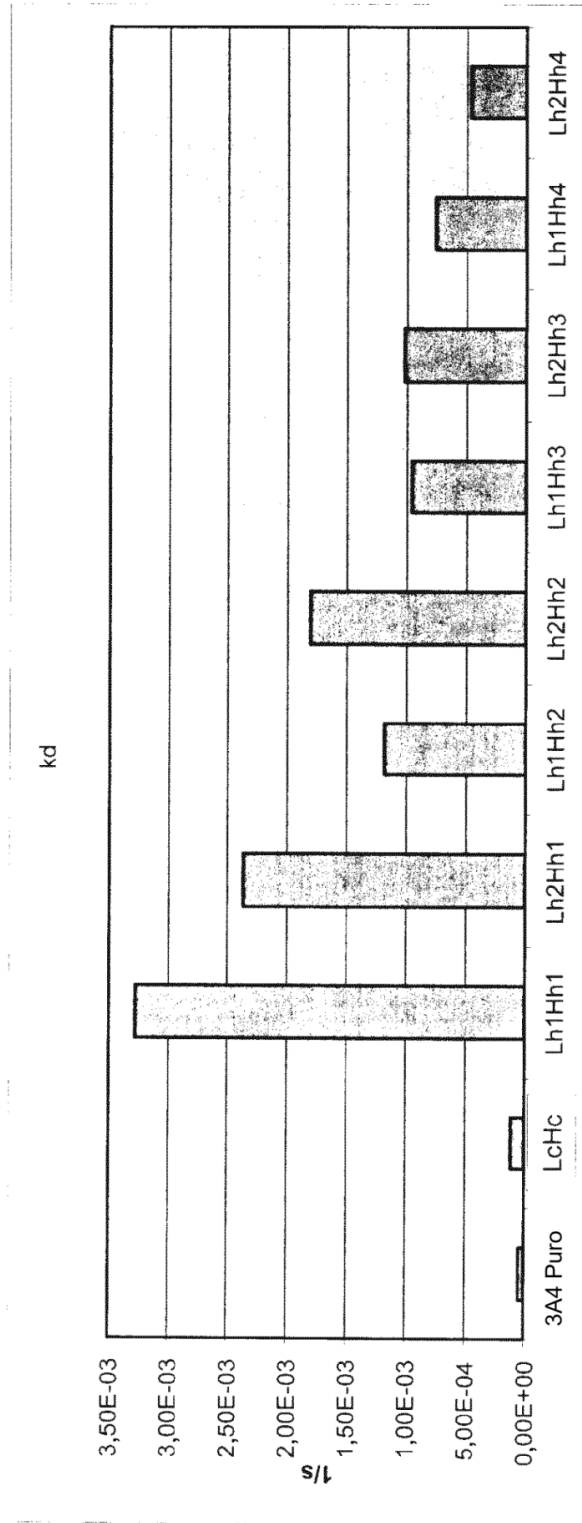


Figura 16C

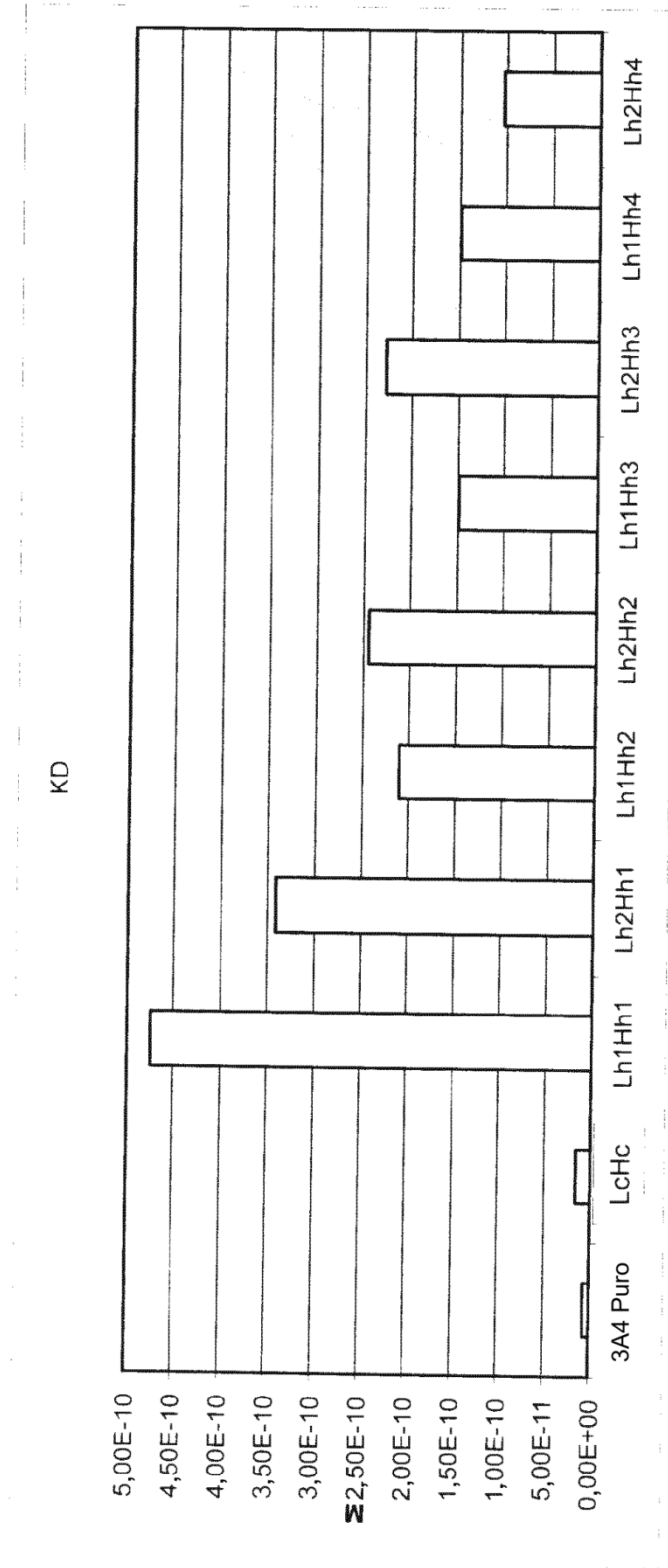


Figura 17a

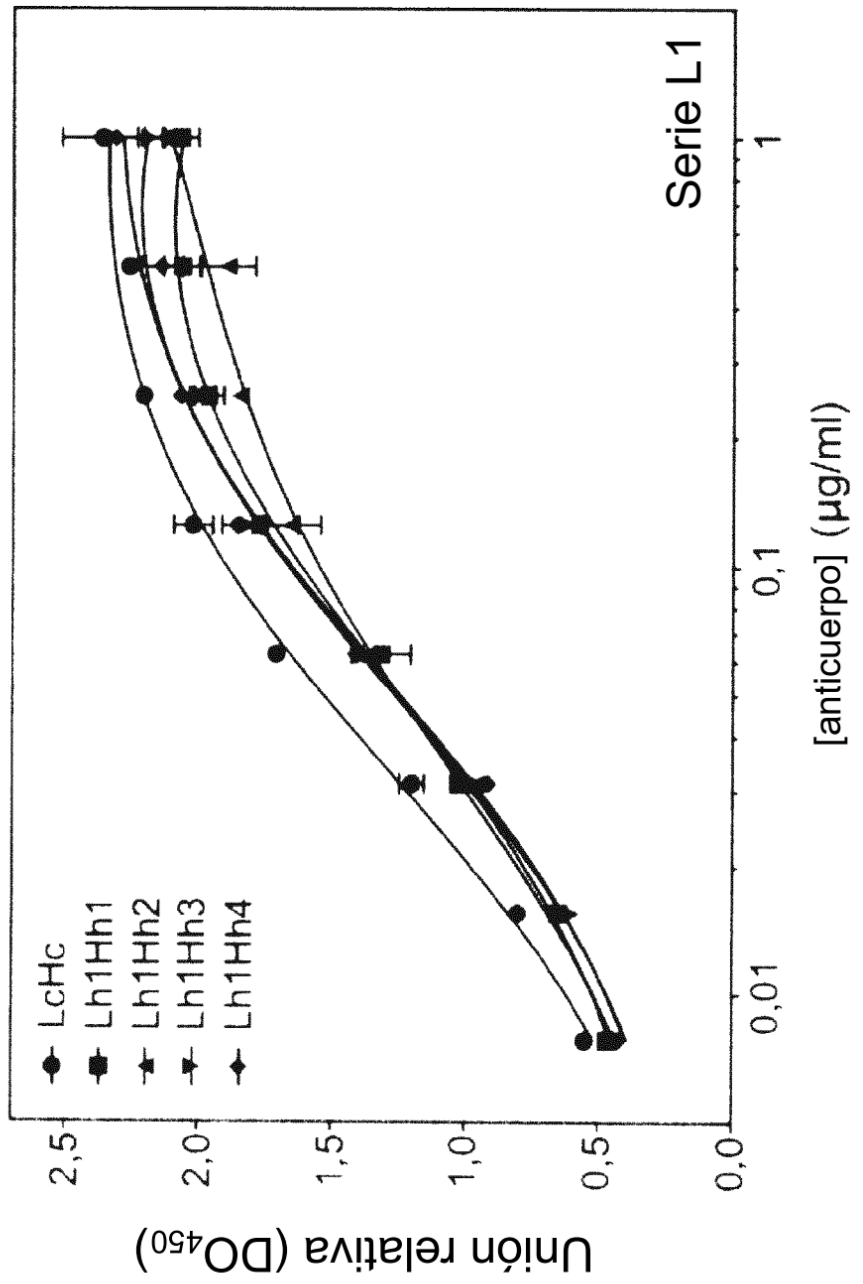


Figura 17b

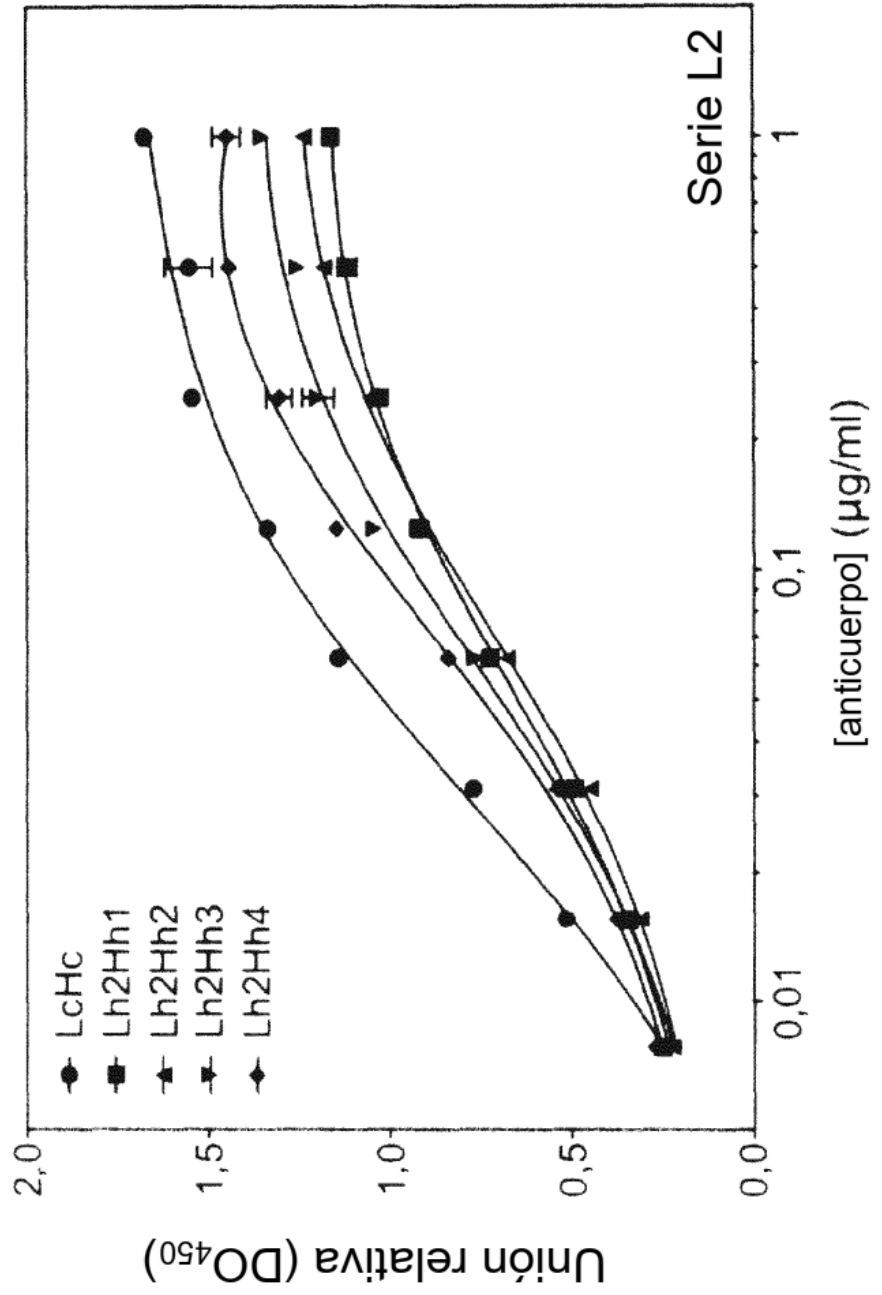


Figura 18

