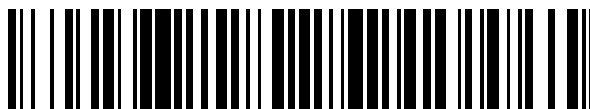


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 273**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C07K 14/21 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014** **PCT/CA2014/050950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015** **WO15048901**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014** **E 14850812 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** **EP 3052525**

54 Título: **Anticuerpos anti-EpCAM y métodos de uso**

30 Prioridad:

02.10.2013 US 201361885817 P
30.07.2014 US 201462030805 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.03.2020

73 Titular/es:

VIVENTIA BIO INC. (100.0%)
147 Hamelin Street
Winnipeg, MB R3T 3Z1, CA

72 Inventor/es:

CIZEAU, JEANNICK;
PREMSUKH, ARJUNE;
CHOONIEDASS, SHILPA;
MACDONALD, GLEN y
ENTWISTLE, JOYCELYN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 747 273 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 anti-EpCAM y métodos de uso

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 61/885.817 presentada el 2 de octubre de 2013, y a la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/030.805 presentada el 30 de julio de 2014.

Breve resumen de la invención

Las realizaciones de la invención están definidas por las reivindicaciones. La descripción también proporciona aspectos adicionales.

10 La presente descripción está relacionada con anticuerpos e immunoconjugados que potencialmente carecen de epítopos de células T e incitan una respuesta inmune reducida. Un anticuerpo puede comprender una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo tal como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, armazones que no son de 15 inmunoglobulina, multímeros, y cualquier combinación de los mismos. Los anticuerpos de la invención se unen a una molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) antigénica. En realizaciones adicionales, una composición puede incluir el anticuerpo descrito en la presente memoria y un excipiente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable.

20 Un immunoconjugado puede comprender un anticuerpo (o fragmento del mismo) unido a una molécula efectora, en donde el anticuerpo puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la molécula efectora puede ser un radioisótopo, un agente antineoplásico, un inmunomodulador, un modificador de la respuesta biológica, lectina, una toxina, un cromóforo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un ion metálico y cualquier 25 combinación de los mismos.

30 Un método para tratar a un sujeto con cáncer puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un immunoconjugado que comprende un anticuerpo unido a una molécula efectora, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la molécula efectora puede ser radioisótopos, agentes antineoplásicos, inmunomoduladores, modificadores de la respuesta biológica, lectinas, toxinas, un cromóforo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un ion metálico y cualquier combinación de los mismos. El método puede comprender además detectar o someter a imaginología el immunoconjugado en el sujeto. En realizaciones 35 adicionales, el método puede comprender además eliminar tejido canceroso del sujeto que se detecta o se somete a imaginología.

40 Un método para diagnosticar, detectar o monitorizar el cáncer en un sujeto puede comprender poner en contacto una muestra de ensayo tomada de dicho sujeto con un anticuerpo para formar un complejo anticuerpo-antígeno, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12; medir la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo; y se proporciona normalizar los resultados frente a un control.

45 Un método para diagnosticar, detectar o monitorizar el cáncer en un sujeto puede implicar administrar al sujeto un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12; y detectar el anticuerpo en el sujeto.

Un kit para diagnosticar, detectar o monitorizar el cáncer puede incluir un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12, e instrucciones para uso del mismo.

50 Un método de imaginología de un tumor en un sujeto puede implicar administrar al sujeto un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12; y detectar el anticuerpo por imaginología *in vivo*.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un esquema de una realización de la presente invención, en particular, el fragmento Fab VB5-845 desinmunizado (VB5-845-DI), así como el fragmento Fab VB5-845 no desinmunizado (VB5-845-WT).

5 La FIG. 2 muestra el análisis de la secuencia V_H-WT (V_H-tipo salvaje) usando iTope™. Las regiones que contienen péptidos potencialmente inmunogénicos se indican en las filas "Promiscuo Alto" y "Promiscuo Moderado".

La FIG. 3 muestra el análisis de la secuencia V_L-DI (V_H-desinmunizada) usando iTope™. Las regiones que contienen péptidos potencialmente inmunogénicos se indican en las filas "Promiscuo Alto" y "Promiscuo Moderado".

La FIG. 4 muestra el análisis de la secuencia V_L-WT (V_L-tipo salvaje) usando iTope™. Las regiones que contienen péptidos potencialmente inmunogénicos se indican en las filas "Promiscuo Alto" y "Promiscuo Moderado".

10 La FIG. 5 muestra el análisis de la secuencia V_L-DI (V_L-desinmunizada) usando iTope™. Las regiones que contienen péptidos potencialmente inmunogénicos se indican en las filas "Promiscuo Alto" y "Promiscuo Moderado".

La FIG. 6 muestra el análisis de las secuencias V_L-DI y V_L-DIF (V_L-DI más C-terminal adicional) que abarcan el cambio de un solo aminoácido usando iTope™.

15 La FIG. 7 muestra la especificidad de unión de VB5-845-DI y VB5-845-WT frente a Cal-27 positivo para EpCAM y A-375 positivo para EpCAM, medido por citometría de flujo.

La FIG. 8 muestra la unión dependiente de la dosis de VB5-845-DI a la línea celular de carcinoma de células escamosas H&N positivas para EpCAM Cal27. La unión se expresa como las veces de aumento medio de la fluorescencia media sobre el control de PBS, por citometría de flujo.

20 La FIG. 9 muestra la afinidad de unión de los VB5-845-WT y VB5-845-DI frente a las células Cal-27, medida por citometría de flujo. La FIG. 10 muestra ensayos de competición entre variantes de VB5-845 y VB6-845 por citometría de flujo.

La FIG. 11 representa la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de VB5-845-DI.

La FIG. 12 muestra la alineación de los dominios V_H y V_L de VB5-845-WT y VB5-845-DI, con la numeración de Kabat.

25 La FIG. 13 describe el ensayo de competición de VB6-845 con VB5-845-Algo (círculo abierto). El círculo negro y el triángulo negro corresponden a VB5-845-WT y VB4-845, respectivamente.

La FIG. 14 muestra el análisis por transferencia Western de la estabilidad en suero de VB5-845-Algo. Los carriles 1 a 4 corresponden a VB5-845-WT a las 0, 3, 6 y 24 horas. Los carriles 5 a 8 a VB5-845-Algo 0, 3, 6 y 24 horas. El carril 9 es solo suero humano. L: escalera y C: control.

30 La FIG. 15 muestra la termoestabilidad de VB5-845-WT (gris) y VB5-845-Algo (negro), expresada como un % de la hora 0 de un duplicado promedio.

La FIG. 16 muestra el perfil de inmunogenicidad del VB5-845-Algo medido por la proliferación de ensayos de células T CD3+CD4+.

La FIG. 17 muestra la alineación de los dominios V_H y V_L de VB5-845-WT y VB5-845 Algo, con la numeración de Kabat.

35 Descripción detallada

Esta invención no se limita a los procesos, composiciones o metodologías particulares descritos, ya que estos pueden variar. La terminología usada en la descripción tiene el propósito de describir únicamente las versiones o realizaciones particulares, y no pretende que limite el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la

40 presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha descripción en virtud de la invención anterior.

Las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen una referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a un "antioxidante" es una referencia a uno o más antioxidantes y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

45

El término "aproximadamente" significa más o menos el 10% del valor numérico del número con el que se está usando. Por lo tanto, aproximadamente el 50% significa en el rango de 45%-55%.

El término "animal", "paciente" o "sujeto" tal y como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a, vertebrados humanos y no humanos tales como animales salvajes, domésticos y de granja.

Los "fragmentos de anticuerpos" que pueden usarse incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, multímeros y cualquier combinación de los mismos, y fragmentos de fuentes recombinantes y/o producidos en animales transgénicos. El anticuerpo o fragmento puede ser de cualquier especie, incluidos ratones, ratas, conejos, hámsteres y seres humanos. Los derivados de anticuerpos quiméricos, es decir, las moléculas de anticuerpos que combinan una región variable animal no humana y una región constante humana también se contemplan dentro del alcance de la invención. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos humanizados que comprenden el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se pueden usar métodos convencionales para preparar anticuerpos quiméricos. Se espera que los anticuerpos quiméricos sean menos inmunogénicos en un sujeto humano que el anticuerpo no quimérico correspondiente. Los anticuerpos humanizados pueden estabilizarse adicionalmente, por ejemplo, como se describe en el documento WO 00/61635 y se incorpora por referencia en su totalidad.

"Agentes anticancerígenos" se refiere a compuestos o tratamientos que son efectivos en el tratamiento o prevención del cáncer, incluidos, sin limitación, agentes químicos, otros inmunoterapéuticos, vacunas contra el cáncer, compuestos antiangiogénicos, ciertas citoquinas, ciertas hormonas, terapia génica, radioterapia, cirugía y terapia dietética.

"Desinmunizado" se refiere a una molécula que carece o incita una respuesta inmune reducida en comparación con el equivalente de tipo salvaje.

"Anticuerpos desinmunizados" o "fragmentos de anticuerpos desinmunizados" se refiere a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que carecen de uno o más epítomos de células T e incitan una respuesta inmune reducida en comparación con el equivalente de tipo salvaje.

"VB5-845 desinmunizado" se refiere al fragmento Fab del anticuerpo EpCAM en donde los supuestos epítomos de células T en el dominio V_H y el dominio V_L están mutados y podrían incitar una respuesta inmune reducida en comparación con el fragmento Fab no desinmunizado VB5-845 (VB5-845-WT). El fragmento Fab VB5-845 desinmunizado (VB5-845-DI) comprende un dominio V_H-C_H desinmunizado (SEQ ID NO: 1) y un dominio V_L-C_L desinmunizado (SEQ ID NO: 2). El fragmento Fab VB5-845 no desinmunizado (VB5-845-WT) comprende un dominio V_H-C_H de tipo salvaje (SEQ ID NO: 5) y un dominio V_L-C_L de tipo salvaje (SEQ ID NO: 6).

"Cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Las cantidades efectivas de un inmunoconjugado pueden variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del animal. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

"Anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado" significa que el anticuerpo o fragmento comprende regiones marco humanas.

"Inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo conjugado con una molécula efectora. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, multímeros y cualquier combinación de los mismos, y fragmentos de fuentes recombinantes y/o producidos en animales transgénicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una proteína sintética, una proteína de unión o un polipéptido. En algunas realizaciones, la molécula efectora puede ser una toxina, un radionucleótido, un radiofármaco, un agente marcador, un fármaco, un agente citotóxico, un péptido, una proteína y similares. Estas moléculas efectoras pueden ser capaces de matar, lisar o marcar o inducir otros efectos cuando el anticuerpo se une a un antígeno.

"Propensión reducida para incitar una respuesta inmune" tal y como se usa en la presente memoria significa que el anticuerpo EpCAM modificado o el fragmento de anticuerpo es menos inmunogénico que el anticuerpo EpCAM no modificado.

La "respuesta inmune" incluye respuestas inmunes tanto celulares como humorales.

El término "se administra directamente al sitio del cáncer" se refiere a la introducción directa o sustancialmente directa que incluye, sin limitación, inyecciones únicas o múltiples del inmunoconjugado directamente en el tumor o peritumoralmente, perfusión continua o discontinua en el tumor o peritumoralmente, introducción de un reservorio en el tumor o peritumoralmente, introducción de un aparato de liberación lenta en el tumor o peritumoralmente, introducción de una formulación de liberación lenta en el tumor o peritumoralmente, aplicación directa sobre el tumor, inyección directa en una arteria que alimenta sustancialmente directamente el área del tumor, inyección directa en un vaso linfático que drena sustancialmente en el área del tumor, introducción directa o sustancialmente directa en una cavidad sustancialmente cerrada (p. ej., cavidad pleural) o luz (p. ej., intravesicular). "Peritumoral" es un término que describe una región, dentro de aproximadamente 10 cm, preferiblemente dentro de 5 cm, más preferiblemente dentro de 1 cm, de lo que se considera el límite tumoral, tal como, pero no limitado a, un borde tumoral palpable. La

"administración directa" en el contexto de la prevención de la aparición o la prevención de la recurrencia se define como la administración directamente en un sitio con riesgo de desarrollo o recurrencia de un cáncer.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere al uso clínico general y/o aprobación por parte de una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, listado en la Farmacopea de los Estados Unidos, o aceptación general por parte de los expertos en la técnica relevante.

Las "condiciones fisiológicas" para la unión de anticuerpos reflejan, pero no necesariamente duplican exactamente, las condiciones en las que un polipéptido de unión a EpCAM encontraría una molécula de EpCAM *in vivo*. La unión en condiciones fisiológicas debe ser razonablemente predictiva de que la unión ocurrirá *in vivo*.

"Prevención del cáncer" se refiere a la prevención de la aparición del cáncer. En ciertos casos, el tratamiento preventivo reduce la recurrencia del cáncer. En otros casos, el tratamiento preventivo disminuye el riesgo de que un paciente desarrolle un cáncer o inhibe la progresión de un estado precanceroso (p. ej., un pólipo del colon) a malignidad real.

"Dosis reducida" se refiere a una dosis que está por debajo de la dosis normalmente administrada y/o recomendada. La dosis administrada normalmente de un agente anticancerígeno se puede encontrar en materiales de referencia bien conocidos en la técnica, como, por ejemplo, la última edición de la Physician's Desk Reference.

"Tratamiento del cáncer" se refiere a la inhibición de la replicación de las células cancerosas, la apoptosis, la inhibición de la propagación del cáncer (metástasis), la inhibición del crecimiento tumoral, la reducción del número de células cancerosas o el crecimiento tumoral, la disminución del grado maligno de un cáncer (p. ej., aumento de la diferenciación) o síntomas relacionados con la mejoría del cáncer.

"Terapéutico" significa un agente utilizado para desalentar, combatir, mejorar, prevenir o mejorar una afección, enfermedad o síntoma no deseado de un paciente.

"Variante" se refiere a cualquier derivado, análogo o fragmento farmacéuticamente aceptable de un inmunoconjugado, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, una toxina (p. ej., toxina de *Pseudomonas*) o una molécula efectora descrita en la presente memoria. Una variante también engloba uno o más componentes de un multímero, multímeros que comprenden un componente individual, multímeros que comprenden múltiplos de un componente individual (p. ej., multímeros de una molécula de referencia), un producto de degradación química y un producto de degradación biológica. Un inmunoconjugado puede ser una "variante" en relación con un inmunoconjugado de referencia en virtud de alteración o alteraciones en la porción de unión a EpCAM y/o la porción de toxina del inmunoconjugado de referencia. Por ejemplo, un inmunoconjugado variante puede contener multímeros de la porción de anticuerpo y/o la porción de toxina. Una variante de la porción de toxina de la molécula retiene una toxicidad de al menos el 10%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 80%, al menos el 90%, en un ensayo estándar usado para medir la toxicidad de una preparación de la toxina de referencia. Una variante también puede referirse a polipéptidos que tienen al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o un 95% de identidad de secuencia con el inmunoconjugado de la presente invención. Un anticuerpo variante puede referirse a polipéptidos o proteínas que tienen al menos un 30%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o un 95% de identidad de secuencia del anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo variante o el inmunoconjugado puede referirse a polipéptidos o proteínas que tienen al menos un 30%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o un 95% de afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención cuando se mide mediante un ensayo de unión competitivo.

Un inmunoconjugado variante que tiene una variación de la porción de unión a EpCAM del inmunoconjugado de referencia compite con la unión de un anticuerpo de referencia anti-EpCAM, en condiciones fisiológicas, en al menos un 10 por ciento y preferiblemente al menos un 30 por ciento (y véase infra). La competición en un 10 por ciento significa que, en un ensayo donde una concentración saturante de anticuerpo de referencia anti-EpCAM se une a EpCAM, el 10 por ciento de estos anticuerpos de referencia unidos se desplaza cuando se alcanza el equilibrio con una concentración equivalente del inmunoconjugado anti-EpCAM variante. Como ejemplo no limitante, la competición entre anticuerpos, o entre un anticuerpo y un inmunoconjugado, se mide uniando el anticuerpo de referencia anti-EpCAM marcado a EpCAM en la superficie de las células o a un sustrato sólido recubierto con EpCAM, de modo que el anticuerpo está unido prácticamente a todos los sitios de EpCAM, poniendo en contacto estos complejos de anticuerpo-antígeno con el anticuerpo anti-EpCAM de ensayo sin marcar o el inmunoconjugado de ensayo sin marcar, y midiendo la cantidad de anticuerpo marcado desplazado de los sitios de unión de EpCAM, en donde la cantidad de anticuerpo marcado libre liberado indica la cantidad de competición que ha ocurrido.

"VB5-845" se refiere a un fragmento Fab del anticuerpo EpCAM sin conjugado con toxina.

"VB6-845" se refiere a un fragmento Fab del anticuerpo EpCAM genéticamente unido a una toxina de la proteína bouganina (deBouganina) modificada.

"4D5MOC-B" o "4D5" significa el anticuerpo humanizado scFv MOC31 injertado en el marco de consenso humano artificial de scFv 4D5 como se describe en el documento WO 00/61635. 4D5MOC-B está representado por la SEQ ID NO: 8. "Anticuerpo MOC-31" significa el anticuerpo murino anti-EpCAM o anti-EGP-2 y está disponible en fuentes comerciales tales como BioGenex, No. de Cat. MU316-UC, Zymed Laboratories Inc., No. de Cat. 18-0270 o United

States Biological, No. de Cat. M4165.

La inmunoterapia se ha convertido en una herramienta poderosa para combatir el cáncer. Los anticuerpos murinos y humanizados/quiméricos, y sus respectivos fragmentos de anticuerpos, dirigidos frente a antígenos asociados a tumores ("TAA") se han usado para el diagnóstico y la terapia de ciertos cánceres humanos. Las formas no conjugadas, conjugadas con toxinas y radiomarcadas de estos anticuerpos se han usado en dichas terapias.

Un antígeno asociado a tumor de interés para la inmunoterapia es la Molécula de Adhesión de Células Epiteliales (EpCAM), que también se conoce como 17-1 A, KSA, EGP-2 y GA733-2. EpCAM es una proteína transmembrana que se expresa altamente en muchos tumores sólidos, incluidos los carcinomas de pulmón, mama, ovario, colorrectal y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, pero se expresa débilmente en la mayoría de los tejidos epiteliales normales. Su expresión se correlaciona con la tasa de proliferación celular. Los anticuerpos específicos de EpCAM se han usado para obtener imágenes y detectar tumores primarios y metástasis en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Hay muchos casos en los que la eficacia de una proteína terapéutica está limitada por una reacción inmune no deseada a la proteína terapéutica. Varios anticuerpos monoclonales de ratón han mostrado ser prometedores como terapias en varios entornos de enfermedades humanas, pero en ciertos casos, han fallado debido a la inducción de grados significativos de una respuesta de anticuerpos antimurinos humanos (HAMA). Para los anticuerpos monoclonales, se han desarrollado varias técnicas en un intento de reducir la respuesta HAMA. Estos enfoques de ADN recombinante generalmente han reducido la información genética del ratón en la construcción final de anticuerpos al tiempo que aumentan la información genética humana en la construcción final. No obstante, los anticuerpos "humanizados" resultantes, en varios casos, todavía incitaron una respuesta inmune en pacientes.

La clave para la inducción de una respuesta inmune es la presencia dentro de la proteína de los péptidos que pueden estimular la actividad de las células T mediante la presentación en moléculas MHC de clase II, los llamados "epítopos de células T". Dichos epítopos de células T se definen comúnmente como cualquier secuencia de residuos de aminoácidos con la capacidad de unirse a moléculas de MHC de Clase II. Implícitamente, un "epítipo de células T" significa un epítipo, que cuando se une a las moléculas de MHC, puede ser reconocido por un receptor de células T (TCR), y que, al menos en principio, puede provocar la activación de estas células T mediante la participación de un TCR para promover una respuesta de células T. Por lo tanto, es deseable identificar y eliminar los epítopos de células T de los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos y desarrollar mejores anticuerpos/fragmentos de anticuerpos que inciten una respuesta inmune reducida.

Anticuerpos

En la presente memoria, se describen anticuerpos desinmunizados y fragmentos de anticuerpos desinmunizados que se unen a un antígeno de células cancerosas. El antígeno puede ser EpCAM. El anticuerpo puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, multímeros y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

Las secuencias de los fragmentos de cadena ligera y cadena pesada pueden modificarse o reemplazarse con otros aminoácidos de manera que el anticuerpo incite una respuesta inmune reducida en los seres humanos. Para preparar anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos, se puede usar cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos humanos pueden obtenerse cribando bibliotecas de anticuerpos humanos. Otra solución es trasplantar la especificidad de un anticuerpo monoclonal no humano injertando las regiones CDR en un marco humano. En una mejora de dicha técnica, se pueden producir anticuerpos humanizados o fragmentos de

anticuerpos con un comportamiento de unión mejorado incorporando residuos adicionales derivados de dicho anticuerpo no humano. Además de lograr la humanización, se pueden usar técnicas para "reparar" fragmentos de anticuerpos con estabilidad y/o plegamiento o rendimiento subóptimos injertando las CDR de un fragmento scFv con la afinidad y especificidad de unión deseadas en el marco de un scFv diferente, con un comportamiento mejor. Dichos métodos para preparar anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, la producción en ratones SCID e inmunización *in vitro*.

En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo puede ser Fab, y la cadena ligera y la cadena pesada están unidas por un enlace covalente. En algunas realizaciones, el enlace covalente puede ser un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, el enlace covalente puede ser a través de reticuladores químicos, tales como adipimidato de dimetilo, suberimidato de dimetilo y similares. En algunas realizaciones, pueden usarse reticuladores de aminoácidos, tales como (Gly₄-Ser)_n. Las secuencias de la cadena ligera y la cadena pesada descritas en la presente memoria pueden usarse para derivar scFv, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos y similares. Se pueden usar varias estrategias de enlace de proteínas para producir Fab y scFv bivalentes o biespecíficos, así como fusiones de Fab y scFv bifuncionales.

Los fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria pueden clonarse y expresarse en *E. coli* en una forma biológicamente funcional. Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos también pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando células bacterianas o de mamífero.

Puede usarse el proceso de maduración de afinidad mediante el cual puede modificarse la especificidad, afinidad o avidez de unión del anticuerpo descrito en la presente memoria. Se ha ideado una serie de técnicas de laboratorio mediante las cuales se crea diversidad de secuencia de aminoácidos mediante la aplicación de diversas estrategias de mutación, ya sea en el fragmento de anticuerpo completo o en regiones seleccionadas tales como las CDR.

Las secuencias de aminoácidos variantes de la cadena pesada y la cadena ligera tienen al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, lo más preferiblemente al menos un 80%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, e incluso lo más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos variantes de la cadena pesada y la cadena ligera tienen al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, lo más preferiblemente al menos un 80%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, e incluso lo más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOS: 11 y 12, respectivamente.

Inmunoconjugados

En algunas realizaciones, se proporcionan inmunoconjugados. En algunos aspectos, el inmunoconjugado descrito en la presente memoria puede ser un anticuerpo unido a una molécula efectora, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, multímeros y cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede ser cualquiera de los anticuerpos desinmunizados o fragmentos de anticuerpos desinmunizados descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el anticuerpo en el inmunoconjugado puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo en el inmunoconjugado puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En las realizaciones descritas en la presente memoria, la molécula efectora puede ser radioisótopos, agentes antineoplásicos, inmunomoduladores, modificadores de la respuesta biológica, lectinas, toxinas, un cromóforo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un ion metálico y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula efectora puede ser una toxina, tal como abrina, modecina, viscumina, gelonina, bouganina, proteína bouganina modificada o desinmunizada (deBouganina), saporina, ricina, cadena de ricina A, briodina, lufina, momordina, restrictocina, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina pertussis, toxina tetánica, toxina botulínica, toxina de Shigella, toxina del cólera, toxina de la difteria y cualquier combinación de las mismas. En realizaciones, la toxina puede ser deBouganina como se muestra en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 42, o SEQ ID NO: 43. En realizaciones, la toxina puede ser la exotoxina A de *Pseudomonas* como se muestra en la SEQ ID NO: 3.

- En otras realizaciones no limitantes, la toxina comprende un agente que actúa para disrumpir el ADN. Por lo tanto, las toxinas pueden ser, sin limitación, enediinas (p. ej., caliqueamicina y esperamicina) y agentes de molécula pequeña no enediina (p. ej., bleomicina, metidiopropil-EDTA-Fe (II)). Otras toxinas útiles de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, daunorrubicina, doxorubicina, distamicina A, cisplatino, mitomicina C, ecteinascidinas, duocarmicina/CC-1065 y bleomicina/pepleomicina. En otras realizaciones no limitantes, la toxina comprende un agente que actúa para disrumpir la tubulina. Dichas toxinas pueden comprender, sin limitación, rizoxina/maitansina, paclitaxel, vincristina y vinblastina, colchicina, auristatina, dolastatina 10, pelorusida A, agentes alquilantes, agentes antimitóticos, inhibidores de topoisomerasa I y derivados de camptotecina.
- En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina del inmunoconjugado puede ser un agente alquilante que incluye, sin limitación, busulfano, carboxifalatoplatino, clorambucilo, clorozotocina, cisplatino, clomesona, cianomorfolinodoxorrubicina, ciclodisona, dianhidrogalactitol, fluorodopán, hepsulfamo, hicanona, melfalán, mitomicina C, mitozolamida, mostaza nitrogenada, piperazina, piperazinadiona, pipobromano, porfiromicina, mostaza de espirohidantoína, teroxirona, tetraplatino, trietilenomelamina y similares.
- En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina del inmunoconjugado de la invención puede ser un agente antimitótico que incluye, sin limitación, alocolchicina, halicondrina B, colchicina, derivado de colchicina, maitansina, rizoxina, taxol, derivado de taxol, tiocolchicina, tritil cisteína, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina.
- En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina de un inmunoconjugado de la invención puede comprender un inhibidor de topoisomerasa II que incluye, sin limitación, doxorubicina, amonafida, derivado de antrapirazol, pirazoloacridina, bisantreno HCl, daunorrubicina, desoxidoxorrubicina, mitoxantrona, menogaril, N,N-dibencil daunomicina, oxantrazol y rubidazona.
- En otras realizaciones no limitantes, la porción de toxina del inmunoconjugado puede ser un antimetabolito de ARN o ADN que incluye, sin limitación, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, acivicina, aminopterina, derivado de aminopterina, 5,6-dihidro-5-azacitidina, metotrexato, derivado de metotrexato, N- (fosfonoacetil)-L-aspartato, pirazofurina, trimetrexato, 2'-desoxi-5-fluorouridina, glicinato de afidicolina, 5-aza-2'-desoxicitidina, ciclocitidina, guanazol, hidroxiurea, inosina glicoaldehído, macbecina II, pirazoloimidazol, tioguanina y tiopurina.
- En algunas realizaciones, el inmunoconjugado es un fragmento de anticuerpo humanizado que se une al dominio extracelular de EpCAM humano unido a la exotoxina A de *Pseudomonas*. En particular, el inmunoconjugado puede ser un fragmento Fab recombinante estabilizado y humanizado de anticuerpo EpCAM que se ha fusionado a una forma truncada de exotoxina A de *Pseudomonas* (aminoácidos ETA 252-608), como se muestra en la SEQ ID NO: 3. Este inmunoconjugado puede unirse a EpCAM expresado en células cancerosas. Una vez unido, el inmunoconjugado se internaliza y la exotoxina A de *Pseudomonas* mata a las células o bloquea la síntesis de proteínas, lo que conduce a la muerte celular. Es importante destacar que, dado que la mayoría de las células mucosales y los fibroblastos normales no expresan ampliamente EpCAM y, por lo tanto, no pueden internalizar el inmunoconjugado, están protegidas de los posibles efectos secundarios de la exotoxina.
- En algunas realizaciones, el inmunoconjugado puede ser un Fab unido a la exotoxina A de *Pseudomonas*. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la exotoxina A de *Pseudomonas* (aminoácidos ETA 252-608) se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la exotoxina A de *Pseudomonas* (aminoácidos ETA 252-608) se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la exotoxina A de *Pseudomonas* (aminoácidos ETA 252-608) se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la exotoxina A de *Pseudomonas* (aminoácidos ETA 252-608) se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 12.
- En algunas realizaciones, el inmunoconjugado puede ser un fragmento de anticuerpo EpCAM humanizado unido a la proteína bouganina modificada, en donde la bouganina modificada tiene una propensión reducida para incitar una respuesta inmune. En una realización preferida, la bouganina modificada tiene una propensión reducida para activar las células T y la bouganina modificada se modifica en uno o más residuos de aminoácidos en un epítipo de células T. En algunas realizaciones, la proteína bouganina modificada (deBouganina) tiene aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la proteína bouganina modificada puede tener aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la proteína bouganina modificada puede tener aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 33. En algunas realizaciones, la proteína bouganina modificada puede tener aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 42. En algunas realizaciones, la proteína bouganina modificada puede tener aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 43.
- En algunas realizaciones, el inmunoconjugado puede ser un Fab unido a la proteína bouganina modificada. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la proteína bouganina modificada se fusiona al

extremo C de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la proteína bouganina modificada se fusiona al extremo C de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la proteína bouganina modificada se fusiona al extremo C de la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, el Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la proteína bouganina modificada se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 12. El Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la proteína bouganina modificada se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 31. El Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la proteína bouganina modificada se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 12. El Fab puede tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la proteína bouganina modificada se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 32. Pueden tener una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y la proteína bouganina modificada se fusiona con el extremo C de la SEQ ID NO: 12.

En algunos aspectos, el inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 13 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2. El primer y el segundo polipéptido pueden estar unidos por uno o más enlaces disulfuro. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1, 11, 31 o 32, y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 16. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 14 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1, 11, 31 o 32, y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 17. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 34 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1, 11, 31 o 32, y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 35. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 36 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1, 11, 31 o 32, y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 37. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 38 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 40 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 39 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 41 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 44 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 44 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1, 11, 31 o 32, y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 45. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 46 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 46 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1, 11, 31 o 32, y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 47. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 48 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 48 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 49 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2. El inmunoconjugado puede ser VB6-845 Fab que tiene un primer polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 49 y un segundo polipéptido como se muestra en la SEQ ID NO: 12.

El primer y el segundo polipéptido descritos en la presente memoria en los inmunoconjugados anteriores pueden estar unidos por uno o más enlaces de disulfuro.

Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria pueden conjugarse con la molécula efectora por cualquier medio. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede unirse a la toxina por medios químicos o recombinantes. Los medios químicos para preparar fusiones o conjugados son conocidos en la técnica y pueden usarse para preparar el inmunoconjugado. El método usado para conjugar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo y la toxina debe ser capaz de unir el anticuerpo con la toxina sin interferir con la capacidad del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unirse a la molécula diana.

En una realización, el anticuerpo y la toxina son ambas proteínas y se pueden conjugar usando técnicas bien conocidas en la técnica. Hay varios cientos de reticuladores descritos en la técnica que pueden conjugar dos proteínas. El

reticulador generalmente se elige en función de los grupos funcionales reactivos disponibles o insertados en el anticuerpo o la toxina. Además, si no hay grupos reactivos, se puede usar un reticulador fotoactivable. En ciertos casos, puede ser deseable incluir un espaciador entre el anticuerpo y la toxina. Los agentes de reticulación conocidos en la técnica incluyen los agentes homobifuncionales: glutaraldehído, dimetiladipimidato y bis(diazobencidina) y los agentes heterobifuncionales: m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida y sulfo-m maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida.

Otros reticuladores que pueden usarse para acoplar una molécula efectora al fragmento de anticuerpo incluyen TPCH (S-(2-tiopiridil)-L-cisteína hidrazida y TPMPH ((S-(2-tiopiridil)mercapto-propionohidrazida). TPCH y TPMPH reaccionan en los restos de carbohidratos de las glicoproteínas que han sido previamente oxidados por tratamiento suave con peryodato, formando así un enlace de hidrazona entre la porción de hidrazida del reticulador y los aldehídos generados por el peryodato. Los reticuladores heterobifuncionales GMBS (N-gama-maleimidobutiriloxi)-succinimida) y SMCC (succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano) reaccionan con aminas primarias, introduciendo así un grupo maleimida en el componente. Este grupo maleimida puede reaccionar posteriormente con sulfhidrilos en el otro componente, que puede introducirse mediante reticuladores mencionados anteriormente, formando así un enlace tioéter estable entre los componentes. Si el impedimento estérico entre los componentes interfiere con la actividad de cualquiera de los componentes, se pueden usar reticuladores que introducen brazos espaciadores largos entre los componentes e incluyen derivados, tales como n-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Por lo tanto, existe una gran cantidad de reticuladores adecuados que se pueden usar y cada uno de los cuales se selecciona según los efectos que tenga sobre la producción óptima de inmunoconjugado.

También se puede preparar una proteína de fusión de anticuerpo-molécula efectora usando técnicas de ADN recombinante. En tal caso, una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo se fusiona con una secuencia de ADN que codifica una molécula efectora, tal como una toxina, dando como resultado una molécula de ADN quimérica. La secuencia de ADN quimérica se transfecta en una célula huésped que expresa la proteína de fusión de molécula efectora-anticuerpo. La proteína de fusión puede recuperarse del cultivo celular y purificarse usando técnicas conocidas en la técnica.

La porción de anticuerpo de un inmunoconjugado puede derivarse de inmunoglobulina, es decir, puede rastrearse hasta una molécula de partida que es una inmunoglobulina (o anticuerpo). Por ejemplo, el anticuerpo puede producirse mediante la modificación de un armazón de inmunoglobulina usando técnicas estándar conocidas en la técnica. En otro ejemplo no limitante, los dominios de inmunoglobulina (p. ej. cadenas pesadas y/o ligeras variables) se pueden unir a un armazón distinto de inmunoglobulina. Además, el anticuerpo puede desarrollarse mediante, sin limitación, reacción química o diseño genético. Por consiguiente, en un ejemplo no limitante, un inmunoconjugado puede comprender un polipéptido derivado de inmunoglobulina (p. ej., un anticuerpo seleccionado de una biblioteca de anticuerpos), o una variante del mismo, que se une específicamente a células de cáncer de hígado; y una toxina o variante de la misma. Dichos polipéptidos de inmunoglobulina pueden rediseñarse para afectar sus características de unión a una molécula asociada a un tumor diana, o para mejorar sus características físicas, por ejemplo.

La porción de anticuerpo del inmunoconjugado no necesita estar basada en inmunoglobulina. Por consiguiente, un inmunoconjugado puede comprender un polipéptido no inmunoglobulínico (p. ej., Affibody®), o una variante del mismo, que se une específicamente a las células de cáncer de hígado; y una toxina o variante de la misma. Dicho polipéptido no inmunoglobulínico puede diseñarse para unirse a una molécula asociada a tumor diana. Además, el polipéptido no inmunoglobulínico puede modificarse por ingeniería para obtener una afinidad o avidez deseada y puede diseñarse para tolerar una variedad de condiciones físicas, incluyendo rangos de pH extremos y temperatura relativamente alta.

De hecho, para su uso en una composición farmacéutica, puede ser ventajoso el diseño de un polipéptido no inmunoglobulínico con una vida media relativamente larga en condiciones fisiológicas (p. ej., 37 °C en presencia de peptidasas). Además, dichas moléculas, o variantes de las mismas, pueden demostrar buena solubilidad, tamaño pequeño, plegamiento apropiado y pueden expresarse en sistemas bacterianos de bajo costo fácilmente disponibles y, por lo tanto, fabricarse en cantidades comercialmente razonables. La capacidad de diseñar un polipéptido no inmunoglobulínico está dentro de la habilidad del experto en la técnica.

Los ejemplos de polipéptidos de unión a epítomos incluyen, sin limitación, ligandos que comprenden un dominio de fibronectina tipo III, moléculas de unión basadas en el ensamblaje de dominios de proteína repetidos que comprenden dominios de homología de pleckstrina (PH), repeticiones de anquirina y similares.

En otras realizaciones no limitantes, el inmunoconjugado comprende una variante que tiene secuencias de aminoácidos, idénticas al menos en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% a la exotoxina A de *Pseudomonas* como se muestra en la SEQ ID NO: 3.

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende una variante que tiene secuencias de aminoácidos, idénticas al menos en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% a la proteína bouganina como se muestra en la SEQ ID NO: 4.

Métodos de uso

En la presente memoria, se describen métodos para usar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos e inmunoconjugados

descritos en la presente memoria. Los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y/o los inmunoconjugados usados pueden incluir cualquiera de los anticuerpos/fragmentos de anticuerpos desinmunizados descritos en la presente memoria, en donde el anticuerpo/fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12.

Un método para tratar a un sujeto con cáncer puede implicar la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, multímeros y cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede ser cualquiera de los anticuerpos desinmunizados o fragmentos de anticuerpos desinmunizados descritos en la presente memoria. El anticuerpo además comprende una molécula efectora unida al anticuerpo (colectivamente, un inmunoconjugado). En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la molécula efectora puede ser un radioisótopo, un agente antineoplásico, un inmunomodulador, un modificador de la respuesta biológica, lectina, una toxina, un cromóforo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un ion metálico y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los inmunoconjugados pueden usarse para tratar cáncer, tal como cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, de esófago, páncreas y cáncer de próstata. Los cánceres que se originan en cualquier célula epitelial también pueden ser una diana de estos inmunoconjugados y anticuerpos.

En realizaciones preferidas no limitantes, el cáncer es susceptible de tratamiento mediante la administración directa del inmunoconjugado al sitio del cáncer. Por ejemplo, una masa tumoral diana puede estar cerca de la superficie de la piel. En otro ejemplo, un tejido enfermo puede estar encapsulado por un quiste, o se encuentra en una cavidad sustancialmente cerrada que incluye, sin limitación, una luz. En otras realizaciones, el cáncer es susceptible de tratamiento por la administración intravenosa del inmunoconjugado.

Un kit para diagnosticar el cáncer puede incluir un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12, e instrucciones para su uso. Un kit para diagnosticar el cáncer puede incluir un inmunoconjugado, en donde dicho inmunoconjugado comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12, unida a una molécula efectora e instrucciones para su uso. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede ser cualquiera de los anticuerpos desinmunizados o fragmentos de anticuerpos desinmunizados descritos en la presente memoria.

Un kit para detectar el cáncer puede incluir un fragmento de anticuerpo anti-EpCAM, y preferiblemente incluye además un reactivo que contiene un anticuerpo anti-Ig marcado, por ejemplo, un anticuerpo anti-Ig unido a una enzima como la fosfatasa alcalina o un anticuerpo anti-Ig radiomarcado. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo anti-EpCAM puede unirse a un cromóforo, un fluoróforo o un ligando radiomarcado.

Los inmunoconjugados y los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden usarse para detectar o monitorizar en un sujeto. Un método para detectar o monitorizar el cáncer en un sujeto puede implicar poner en contacto una muestra de ensayo tomada del sujeto con un anticuerpo para formar un complejo antígeno-anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12; medir la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo; y normalizar los resultados frente a un control. La muestra de ensayo puede ser suero, linfa, exudado ascítico, líquido intercelular, lisado de tejido, saliva, secciones de tejido, células, muestras de biopsia y similares. El complejo anticuerpo-antígeno se puede detectar por cualquier medio, como, por ejemplo, el método de hibridación sobre mancha, el método de transferencia Western, el método de ELISA o el método de ELISA en sandwich. Además, el complejo anticuerpo-antígeno puede detectarse mediante el uso de acuerdo con reacciones de múltiples etapas, tales como la reacción con un anticuerpo anti-Ig unido a biotina y luego con un material unido a avidina. Un método para detectar o monitorizar el cáncer en un sujeto puede implicar poner en contacto una muestra de ensayo tomada del sujeto con un inmunoconjugado para formar un complejo, en donde el inmunoconjugado comprende un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12; medir la cantidad del complejo en la muestra de ensayo; y normalizar los resultados frente a un control.

Un método para detectar o monitorizar el cáncer en un sujeto puede implicar administrar al sujeto un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12; y detectar el anticuerpo. Un método para detectar o monitorizar el cáncer en un sujeto

puede implicar administrar al sujeto un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que tiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 12; y detectar el inmunoconjugado.

- 5 Los anticuerpos y los inmunoconjugados descritos en la presente memoria pueden usarse para obtener imágenes de un tumor en un sujeto. Un método de imagenaría de un tumor en un sujeto puede implicar administrar al sujeto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12; y detectar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo mediante
- 10 imagenaría *in vivo*. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede ser cualquiera de los anticuerpos desinmunizados o fragmentos de anticuerpos desinmunizados descritos en la presente memoria y puede estar unido a una molécula efectora. Un método para obtener imágenes de un tumor en un sujeto puede implicar administrar al sujeto un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que tiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32; y una cadena ligera que tiene una
- 15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 12; y detectar el inmunoconjugado por imagenaría *in vivo*. El inmunoconjugado puede incluir además una molécula efectora.

En algunas realizaciones, la molécula efectora utilizada para detectar el cáncer o para imagenaría de un tumor puede ser un radioisótopo, un cromóforo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un ion metálico y cualquier combinación de los mismos. Las imagenaría *in vivo* se puede realizar mediante cualquier técnica conocida

20 en la técnica, tal como imagenaría de fluorescencia de infrarrojo cercano (NIRF), imagenaría de reflectancia de fluorescencia (FRI), tomografía mediada por fluorescencia (FMT), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotones únicos (SPECT), imagenaría por resonancia magnética (MRI), PET con imagenaría por tomografía computarizada concurrente (PET/CT), PET con imagenaría por resonancia magnética concurrente (PET/MRI) y cualquier combinación de los mismos.

- 25 El método puede incluir además la resección de tejido canceroso, tal como un tumor o una parte de un órgano, después de la imagenaría *in vivo* del sujeto. La resección quirúrgica se puede realizar mediante cualquier técnica conocida en la técnica. El método puede incluir además administrar el anticuerpo o inmunoconjugado después de la resección para medir la compleción de la resección tumoral.

En ciertos aspectos, los anticuerpos como se describen en la presente memoria están marcados con un radiotrazador.

30 Un radiotrazador es típicamente una sustancia que contiene un radioisótopo que permite una fácil detección y medición. Una serie de formas diferentes de hidrógeno, carbono, fósforo, azufre y yodo se utilizan comúnmente en el diagnóstico médico. Los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse con cualquier radiotrazador adecuado. Los radiotrazadores preferidos incluyen radiotrazadores para imagenaría médica. Los radiotrazadores comunes usados incluyen ^{18}F , ^{67}Ga , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, ^{82}Rb , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{201}Tl e ^{90}Y . Preferiblemente, los anticuerpos como se

35 describen en la presente memoria están marcados con ^{18}F , $^{123/131}\text{I}$, ^{111}In , ^{90}Y o $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden marcarse con cualquier sonda fluorescente conocida en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen fluoresceína, ácido acético amino cumarina, isocianato de tetrametilcodomina, Rojo Texas, Cy 3.0, Cy 5.0, proteína verde fluorescente y similares.

En otro aspecto preferido, los anticuerpos como se describen en la presente memoria están marcados con un agente de contraste.

40 Un agente de contraste es una sustancia usada para aumentar o modificar el contraste de órganos, fluidos o estructuras anatómicas en el cuerpo humano o animal. Los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse con cualquier agente de contraste adecuado. Los agentes de contraste preferidos incluyen agentes de contraste para imagenaría médica. Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención están marcados con un agente de contraste de MRI (imagenaría por resonancia magnética) tal como un agente de contraste superparamagnético o un agente de contraste paramagnético. Los agentes de contraste de MRI son típicamente metales quelados o coloides. Los agentes de contraste más comúnmente usados incluyen agentes de contraste a base de gadolinio (Gd) tales como gadolinio-DTPA, agentes de contraste a base de óxido de hierro tales como

45 partículas pequeñas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO) y partículas pequeñas ultrapequeñas superparamagnéticas de óxido de hierro (USPIO) y agentes de contraste paramagnéticos a base de quelatos de manganeso tales como Mn-DPDP.

50

La descripción también proporciona métodos para reducir el riesgo de complicaciones postquirúrgicas que comprenden administrar una cantidad efectiva de un inmunoconjugado antes, durante o después de la cirugía, y en realizaciones específicas no limitantes, cirugía para tratar el cáncer.

- 55 La descripción también proporciona métodos para prevenir la aparición, prevenir o retrasar la recurrencia, o reducir la tasa de recurrencia del cáncer que comprenden administrar directamente a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un inmunoconjugado.

La descripción también proporciona métodos para sensibilizar un tumor o cáncer a uno o más agentes anticancerígenos que comprenden administrar un inmunoconjugado de la invención. En un aspecto no limitante, el

otro agente anticancerígeno comprende otro inmunoconjugado dirigido a EpCAM. En otro aspecto no limitante, el otro agente anticancerígeno comprende radiación. Los otros agentes anticancerígenos pueden administrarse antes de, solapándose con, simultáneamente y/o después de la administración del inmunoconjugado. Cuando se administran simultáneamente, el inmunoconjugado y otro agente anticancerígeno pueden administrarse en una sola formulación o en formulaciones separadas, y si están por separado, opcionalmente, por diferentes modos de administración. En consecuencia, la combinación de uno o más inmunoconjugados y uno o más agentes anticancerígenos puede actuar sinérgicamente para combatir el tumor o el cáncer. En algunos aspectos, el inmunoconjugado puede coadministrarse, administrarse simultáneamente o administrarse secuencialmente con uno o más agentes anticancerígenos.

En algunos aspectos, los agentes anticancerígenos pueden ser tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, acetato de megestrol, anastrozol, letrozol, boraol, exemestano, flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona, acetato de goserelina, luprolo, finasterida, herceptina, metotrexato, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina, mitramicina, cisplatino, carboplatino, melfalán, clorambucilo, busulfán, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, tiotefán, vincristina, taxol, taxotere, etopósido, tenipósido, amsacrina, irinotecán, topotecán, una epotilona, Iressa, Tarceva, Sorafenib, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de EGF, inhibidores de VEGF, inhibidores de CDK, citoquinas, inhibidores de Her1 y Her2, y anticuerpos monoclonales.

En otros aspectos, se proporcionan métodos para tratar el cáncer que comprenden administrar un inmunoconjugado en combinación con un régimen de radioterapia. La terapia también puede comprender cirugía y/o quimioterapia. Por ejemplo, el inmunoconjugado puede administrarse en combinación con radioterapia y cisplatino (Platinol), fluorouracilo (5-FU, Adrucil), carboplatino (Paraplatino) y/o paclitaxel (Taxol). El tratamiento con el inmunoconjugado puede permitir el uso de acuerdo con dosis más bajas de radiación y/o tratamientos de radiación menos frecuentes, lo que puede, por ejemplo, reducir la incidencia de dolor de garganta severo que impide la función de deglución, lo que puede provocar potencialmente una pérdida de peso o deshidratación no deseada.

Las composiciones farmacéuticas para la terapia de combinación también pueden incluir, sin limitación, antibióticos (p. ej., dactinomicina, bleomicina, mitramicina, antramicina), asparaginasa, proteína BCG, toxina diftérica, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, agentes antimitóticos, abirina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, agentes antihistamínicos, agentes contra las náuseas, etc.

De hecho, la administración directa de una cantidad efectiva de un inmunoconjugado a un paciente que necesita dicho tratamiento puede dar como resultado dosis reducidas de otro agente anticancerígeno que tenga eficacia clínicamente significativa. Dicha eficacia de la dosis reducida del otro agente anticancerígeno puede no observarse en ausencia de la administración con un inmunoconjugado. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para tratar un tumor o cáncer que comprenden administrar una dosis reducida de uno o más agentes anticancerígenos.

Además, la terapia de combinación que comprende un inmunoconjugado para un paciente que necesita dicho tratamiento puede permitir tiempos de tratamiento relativamente cortos en comparación con la duración o el número de ciclos de regímenes de tratamiento estándar. Por consiguiente, la presente descripción proporciona métodos para tratar un tumor o cáncer que comprenden administrar uno o más otros agentes anticancerígenos durante una duración relativamente corta y/o en menos ciclos de tratamiento.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, las terapias de combinación que comprenden un inmunoconjugado y otro agente anticancerígeno pueden reducir la toxicidad (es decir, los efectos secundarios) del tratamiento global contra el cáncer. Por ejemplo, se puede observar una toxicidad reducida, en comparación con una monoterapia u otra terapia de combinación, cuando se administra una dosis reducida de inmunoconjugado y/u otro agente anticancerígeno, y/o cuando se reduce la duración de un ciclo (es decir, el período de una administración única o el período de una serie de dichas administraciones), y/o cuando se reduce el número de ciclos.

Los resultados clínicos de los tratamientos contra el cáncer que usan un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención son fácilmente discernibles por un experto en la técnica relevante, tal como un médico. Por ejemplo, los ensayos médicos estándar para medir los marcadores clínicos del cáncer pueden ser fuertes indicadores de la eficacia del tratamiento. Dichos ensayos pueden incluir, sin limitación, examen físico, escalas de rendimiento, marcadores de enfermedad, ECG de 12 derivaciones, mediciones tumorales, biopsia de tejido, citoscopia, citología, cálculos del diámetro más largo del tumor, radiografía, imagen digital del tumor, signos vitales, peso, registro de eventos adversos, evaluación de episodios infecciosos, evaluación de medicamentos concomitantes, evaluación del dolor, química sanguínea o sérica, detección de marcadores séricos, análisis de orina, escaneo CT y análisis farmacocinético. Además, los efectos sinérgicos de una terapia de combinación que comprende el inmunoconjugado y otro agente anticancerígeno pueden determinarse mediante estudios comparativos con pacientes sometidos a monoterapia.

La dosis efectiva del anticuerpo o inmunoconjugado a administrar durante un ciclo varía según el modo de administración. La administración directa (p. ej., inyección intratumoral) requiere dosis corporales totales mucho menores de inmunoconjugado en comparación con la administración intravenosa sistémica del inmunoconjugado. Será evidente para el experto en la técnica que la administración local puede dar como resultado dosis corporales más bajas, y en esas circunstancias, y se esperaría y desearía un bajo nivel de inmunoconjugado plasmático en circulación.

- La dosis efectiva por administración directa de anticuerpo o inmunoconjugado puede variar de aproximadamente 10 a 3.000, 20 a 900, 30 a 800, 40 a 700, 50 a 600, 60 a 500, 70 a 400, 80 a 300, 90 a 200, o 100 a 150 microgramos/tumor/día. La dosis puede variar de aproximadamente 10 a 20, 21 a 40, 41 a 80, 81 a 100, 101 a 130, 131 a 150, 151 a 200, 201 a 280, 281 a 350, 351 a 500, 501 a 1.000, 1.001 a 2.000, o 2.001 a 3.000 microgramos/tumor/día. La dosis puede ser al menos aproximadamente 20, 40, 80, 130, 200, 280, 400, 500, 750, 1.000, 2.000 o 3.000 microgramos/tumor/día.
- En otras realizaciones, la administración del inmunoconjugado es a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg/dosis a aproximadamente 2.000 mg/kg/dosis.
- La dosis efectiva de anticuerpo o inmunoconjugado puede variar de aproximadamente 100 a 5.000, 200 a 4.000, 300 a 3.000, 400 a 2.000, 500 a 1.000, 600 a 900, o 700 a 1.500 microgramos/tumor/mes. La dosis puede variar de aproximadamente 100 a 199, 200 a 399, 400 a 649, 650 a 999, 1.000 a 1.799, 1.800 a 2.499, 2.500 a 3.499, 3.500 a 4.999, 5.000 a 7.499, 7.500 a 10.000, o 10.001 a 20.000 microgramos/tumor/mes. La dosis puede ser al menos aproximadamente 100, 200, 400, 650, 1.000, 1.400, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 7.500, 10.000 o 20.000 microgramos/tumor/mes.
- En otra realización, el inmunoconjugado se administra por vía intratumoral a una dosis total por ciclo equivalente a, o inferior a, la dosis máxima tolerada establecida en un ensayo de seguridad, pero la dosis se estandariza en relación con el volumen del tumor. Por ejemplo, los sujetos recibirán entre 1 microgramo por cm^3 y 500 microgramos por cm^3 de tumor o una dosis suficiente para alcanzar aproximadamente entre 14 picomoles y 7 nanomoles por cm^3 de tejido tumoral. La dosis se administrará en un volumen que no exceda de aproximadamente el 20-50% del volumen del tumor. El inmunoconjugado se diluirá en una disolución salina adecuada. Por ejemplo, para un tumor con un volumen estimado de 3 cm^3 , una dosis diana de 14 picomoles (1 microgramo por cm^3) y un volumen relativo de inyección máximo de aproximadamente 1/3 del tumor, se diluirán 3 microgramos de inmunoconjugado en aproximadamente 1 ml de diluyente.
- La dosis efectiva de otro agente anticancerígeno a administrar junto con un anticuerpo o inmunoconjugado durante un ciclo también varía de acuerdo con el modo de administración. El uno o más agentes anticancerígenos pueden administrarse por vía intratumoral o por otros modos de administración. Típicamente, los agentes quimioterapéuticos se administran sistémicamente. La dosificación estándar y los regímenes de tratamiento son conocidos en la técnica (véanse, p. ej., las últimas ediciones del índice Merck y la Physician's Desk Reference).
- Por ejemplo, en una realización, el agente anticancerígeno adicional comprende dacarbazina a una dosis que varía de aproximadamente 200 a 4.000 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$. En una realización preferida, la dosis varía de 700 a 1.000 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$.
- En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende fludarabina a una dosis que varía de aproximadamente 25 a 50 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$.
- En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende arabinósido de citosina (Ara-C) en una dosis que varía de aproximadamente 200 a 2.000 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$.
- En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende docetaxel a una dosis que varía de aproximadamente 1,5 a 7,5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{ciclo}$.
- En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende paclitaxel a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{ciclo}$.
- En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende cisplatino a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{ciclo}$.
- En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende 5-fluorouracilo a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{ciclo}$.
- En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende doxorrubicina a una dosis que varía de aproximadamente 2 a 8 $\text{mg}/\text{kg}/\text{ciclo}$.
- En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende epipodofilotoxina a una dosis que varía de aproximadamente 40 a 160 $\text{mg}/\text{kg}/\text{ciclo}$.
- En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende ciclofosfamida a una dosis que varía de aproximadamente 50 a 200 $\text{mg}/\text{kg}/\text{ciclo}$.
- En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende irinotecán a una dosis que varía de aproximadamente 50 a 75, 75 a 100, 100 a 125, o 125 a 150 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$.
- En otra realización más, el agente anticancerígeno comprende vinblastina a una dosis que varía de aproximadamente 3,7 a 5,4, 5,5 a 7,4, 7,5 a 11 u 11 a 18,5 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$.

En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende vincristina a una dosis que varía de aproximadamente 0,7 a 1,4, o de 1,5 a 2 mg/m²/ciclo.

En otra realización más, el agente anticancerígeno adicional comprende metotrexato a una dosis que varía de aproximadamente 3,3 a 5, 5 a 10, 10 a 100 o 100 a 1.000 mg/m²/ciclo.

- 5 La terapia de combinación con un anticuerpo o inmunoconjugado puede sensibilizar el cáncer o el tumor a la administración de un agente anticancerígeno adicional. Por consiguiente, la presente invención contempla terapias de combinación para prevenir, tratar y/o prevenir la recurrencia del cáncer que comprenden administrar una cantidad eficaz de un inmunoconjugado antes de, posteriormente a o simultáneamente con una dosis reducida de un agente anticancerígeno. Por ejemplo, el tratamiento inicial con un inmunoconjugado puede aumentar la sensibilidad de un
- 10 cáncer o tumor al pulso posterior con una dosis de agente anticancerígeno. Esta dosis está cerca o por debajo del rango bajo de dosificaciones estándar cuando el agente anticancerígeno se administra solo, o en ausencia de un anticuerpo o inmunoconjugado. Cuando se administra simultáneamente, el inmunoconjugado se puede administrar separadamente del agente anticancerígeno, y opcionalmente, a través de un modo diferente de administración.

- 15 Por consiguiente, en una realización, el agente anticancerígeno adicional comprende cisplatino, p. ej., PLATINOL o PLAT-INOL-AQ (Bristol Myers), a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 10, 11 a 20, 21 a 40, o 41 a 75 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende carboplatino, p. ej., PARAPLATINO (Bristol Myers), a una dosis que varía de aproximadamente 2 a 3, 4 a 8, 9 a 16, 17 a 35, o 36 a 75 mg/m²/ciclo.

- 20 En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende ciclofosfamida, p. ej., CITOXÁN (Bristol Myers Squibb), a una dosis que varía de aproximadamente 0,25 a 0,5, 0,6 a 0,9, 1 a 2, 3 a 5, 6 a 10, 11 a 20, o 21 a 40 mg/kg/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende citarabina, p. ej., CITOSAR-U (Pharmacia & Upjohn), a una dosis que varía de aproximadamente 0,5 a 1, 2 a 4, 5 a 10, 11 a 25, 26 a 50 o 51 a 100 mg/m²/ciclo.

- 25 En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende liposoma de citarabina, p. ej., DEPOCIT (Chiron Corp.), a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 50 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende dacarbazina, p. ej., DTIC o DTICDOME (Bayer Corp.), a una dosis que varía de aproximadamente 15 a 250 mg/m²/ciclo o que varía de aproximadamente 0,2 a 2 mg/kg/ciclo.

- 30 En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende topotecán, p. ej., HYCAMTIN (SmithKline Beecham), a una dosis que varía de aproximadamente 0,1 a 0,2, 0,3 a 0,4, 0,5 a 0,8, o 0,9 a 1,5 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende irinotecán, p. ej., CAMPTOSAR (Pharmacia & Upjohn), a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 9, 10 a 25, o 26 a 50 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende fludarabina, p. ej., FLUDARA (Berlex Laboratories), a una dosis que varía de aproximadamente 2,5 a 5, 6 a 10, 11 a 15, o 16 a 25 mg/m²/ciclo.

- 35 En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende arabinósido de citosina (Ara-C) en una dosis que varía de aproximadamente 200 a 2.000 mg/m²/ciclo, 300 a 1.000 mg/m²/ciclo, 400 a 800 mg/m²/ciclo, o 500 a 700 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende docetaxel, p. ej., TAXOTERE (Rhone Poulenc Rorer) a una dosis que varía de aproximadamente 6 a 10, 11 a 30, o 31 a 60 mg/m²/ciclo.

- 40 En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende paclitaxel, p. ej., TAXOL (Bristol Myers Squibb), a una dosis que varía de aproximadamente 10 a 20, 21 a 40, 41 a 70, o 71 a 135 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende 5-fluorouracilo a una dosis que varía de aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg/ciclo, 1 a 4 mg/kg/ciclo, o 2-3 mg/kg/ciclo.

- 45 En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende doxorubicina, p. ej., ADRIAMICINA (Pharmacia y Upjohn), DOXIL (Alza), RUBEX (Bristol Myers Squibb), a una dosis que varía de aproximadamente 2 a 4, 5 a 8, 9 a 15, 16 a 30, o 31 a 60 mg/kg/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende etopósido, p. ej., VEPESID (Pharmacia & Upjohn), a una dosis que varía de aproximadamente 3,5 a 7, 8 a 15, 16 a 25, o 26 a 50 mg/m²/ciclo.

- 50 En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende vinblastina, p. ej., VELBAN (Eli Lilly), a una dosis que varía de aproximadamente 0,3 a 0,5, 0,6 a 0,9, 1 a 2 o 3 a 3,6 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende vincristina, p. ej., ONCOVIN (Eli Lilly), a una dosis

que varía de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente anticancerígeno adicional comprende metotrexato a una dosis que varía de aproximadamente 0,2 a 0,9, 1 a 5, 6 a 10 u 11 a 20 mg/m²/ciclo.

5 En otra realización, se administra un inmunoconjugado en combinación con al menos otro inmunoterapéutico que incluye, sin limitación, rituxán, rituximab, campath-1, gemtuzumab y trastuzutab.

10 En otra realización, se administra un inmunoconjugado en combinación con uno o más agentes antiangiogénicos que incluyen, sin limitación, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, serpina (inhibidor de la serina proteasa), antitrombina, fragmento proteolítico de 29 kDa N-terminal y de 40 kDa C-terminal de fibronectina, fragmento proteolítico de prolactina de 16 kDa, fragmento proteolítico de 7,8 kDa del factor plaquetario 4, un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a un fragmento del factor plaquetario 4, un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a un fragmento de colágeno I, un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de trombospondina I, un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de SPARC y una variante de los mismos, incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15 En otra realización, se administra un inmunoconjugado en combinación con una o más citoquinas que incluyen, sin limitación, linfoquinas, factores de necrosis tumoral, citoquina similar al factor de necrosis tumoral, linfotóxica, interferón, proteína inflamatoria de macrófagos, factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos, interleuquina (incluyendo, sin limitación, interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-6, interleuquina-12, interleuquina-15, interleuquina-18) y una variante de los mismos, incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 En otra realización más, se administra un inmunoconjugado en combinación con una vacuna contra el cáncer que incluye, sin limitación, células o tejidos autólogos, células o tejidos no autólogos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna BCG viva, proteínas de linaje de melanocitos, y antígenos específicos de tumor mutados.

25 En otra realización más, se administra un inmunoconjugado en asociación con terapia hormonal. Los terapéuticos hormonales incluyen, sin limitación, un agonista hormonal, un antagonista hormonal (p. ej., flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON)) y esteroides (p. ej., dexametasona, retinoide, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoide, mineralocorticoide, estrógeno, testosterona, progestina).

En otra realización más, se administra un inmunoconjugado en asociación con un programa de terapia génica para tratar o prevenir el cáncer.

30 En otra realización más, se administra un inmunoconjugado dirigido a EpCAM en combinación con uno o más agentes que aumentan la expresión de EpCAM en las células tumorales de interés. La expresión de EpCAM preferiblemente aumenta de modo que se expresa un mayor número de moléculas de EpCAM en la superficie de la célula tumoral. Por ejemplo, el agente puede inhibir los ciclos normales de la endocitosis del antígeno EpCAM. Dicho tratamiento de combinación puede mejorar la eficacia clínica del inmunoconjugado dirigido a EpCAM solo, o con otros agentes anticancerígenos o radioterapia. En realizaciones específicas no limitantes, el agente que aumenta la expresión de EpCAM en las células tumorales es tartrato de vinorelbina (Navelbina) y/o paclitaxel (Taxol).

35 La terapia de combinación puede aumentar así la sensibilidad del cáncer o tumor al inmunoconjugado y/o al agente anticancerígeno adicional administrados. De esta manera, pueden ser posibles ciclos de tratamiento más cortos, reduciendo así los eventos tóxicos. Por consiguiente, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un inmunoconjugado y al menos otro agente anticancerígeno durante un ciclo de tratamiento corto. La duración del ciclo puede variar de aproximadamente 1 a 30, 2 a 27, 3 a 15, 4 a 12, 5 a 9, o 6-8 días. La duración del ciclo puede variar según el agente anticancerígeno específico en uso. La invención también contempla la administración continua o discontinua, o dosis diarias divididas en varias administraciones parciales. El experto en la técnica apreciará una duración de ciclo apropiada para un agente anticancerígeno específico, y la invención contempla la evaluación continua de programas de tratamiento óptimos para cada agente anticancerígeno. Las pautas específicas para el experto en la técnica se conocen en la técnica.

40 Alternativamente, se pueden desear ciclos de tratamiento más largos. En consecuencia, la duración del ciclo puede variar de aproximadamente 10 a 56, 12 a 48, 14 a 28, 16 a 24 o 18 a 20 días. La duración del ciclo puede variar según el agente anticancerígeno específico en uso.

Rutas de administración

45 Los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en la presente memoria pueden administrarse al paciente a través de cualquier ruta adecuada. Los anticuerpos y/o inmunoconjugados pueden administrarse por inyección en el sistema vascular o por inyección en un órgano. Las rutas de administración preferidas incluyen inyección parenteral, intravascular y/o intravenosa. La administración parenteral incluye inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracavitaria, intratecal, intratumoral, transdérmica e intravenosa. En una realización preferida, los

anticuerpos y/o inmunoconjugados se administran por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo. En otras realizaciones, los anticuerpos y/o inmunoconjugados pueden administrarse directamente en el sitio del cáncer.

El inmunoconjugado y los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse de manera convencional por cualquier ruta en la que sean activos. La administración puede ser sistémica, parenteral, tópica u oral. Por ejemplo, la administración puede ser, pero no se limita a, por las rutas parenteral, oral, bucal u ocular, o intravaginal, por inhalación, por inyecciones de depósito o por implantes. Por lo tanto, los modos de administración para los anticuerpos/inmunoconjugados de la presente invención (ya sea solos o en combinación con otros productos farmacéuticos) pueden ser, pero no están limitados a, sublinguales, inyectables (incluidas formas de acción corta, depósito, implante y pastillas inyectadas por vía subcutánea, o intramuscular), o mediante el uso de acuerdo con cremas vaginales, supositorios, pesarios, anillos vaginales, supositorios rectales, dispositivos intrauterinos y formas transdérmicas tales como parches y cremas.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el inmunoconjugado y/u otro agente anticancerígeno se administra al paciente mediante administración directa. En consecuencia, el inmunoconjugado y/u otro agente anticancerígeno pueden administrarse, sin limitación, mediante una o más inyecciones directas en el tumor, mediante perfusión continua o discontinua en el tumor, mediante la introducción de un reservorio del inmunoconjugado, mediante la introducción de un aparato de liberación lenta en el tumor, mediante la introducción de una formulación de liberación lenta en el tumor, y/o mediante aplicación directa sobre el tumor. Por el modo de administración en el tumor, también se contempla la introducción del inmunoconjugado y/u otro agente anticancerígeno en el área del tumor, o en un vaso sanguíneo o vaso linfático que fluye sustancialmente directamente en el área del tumor. En cada caso, la composición farmacéutica se administra en al menos una cantidad suficiente para alcanzar el punto final, y si es necesario, comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se contempla que los inmunoconjugados pueden administrarse por vía intratumoral, mientras que cualquier otro agente anticancerígeno puede administrarse al paciente por otros modos de administración (p. ej., por vía intravenosa). Además, cuando se pretende administrar múltiples agentes anticancerígenos a un paciente, el inmunoconjugado y uno o más de los otros agentes anticancerígenos pueden administrarse por vía intratumoral, mientras que otros agentes anticancerígenos pueden administrarse por otros modos de administración (p. ej., por vía intravenosa y oral).

En algunas realizaciones, una composición puede ser un anticuerpo de la invención y un excipiente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una composición puede ser un inmunoconjugado de la invención y un excipiente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable. Un inmunoconjugado según la invención puede estar comprendido en una composición farmacéutica o medicamento. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración directa incluyen, sin limitación, polvos liofilizados o disoluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener además antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre de un receptor previsto. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las disoluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. El inmunoconjugado se puede suministrar, por ejemplo, pero no a modo de limitación, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua o disolución salina estéril antes de la administración al paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen composiciones esencialmente químicamente inertes y no tóxicas que no interfieren con la efectividad de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones salinas, disoluciones de glicerol, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfotidil-etanolamina (DOPE) y liposomas. Dichas composiciones deben contener una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración directa al paciente.

En otra realización, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo o inmunoconjugado y uno o más agentes anticancerígenos adicionales, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, aquellas formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina, etc.

En diversas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica se administra directamente en el área del tumor o tumores mediante, por ejemplo, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica (p. ej., junto con un apósito para heridas después de la cirugía), inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio o mediante un implante. Un implante puede ser de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Los supositorios generalmente contienen ingredientes activos en el rango del 0,5% al 10% en peso.

En otras realizaciones, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del tumor diana. Por ejemplo, una microbomba puede administrar dosis controladas directamente en el área del tumor, regulando así finamente el tiempo y la concentración de la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, el vehículo farmacéutico puede incluir, sin limitación, aglutinantes, recubrimientos, disgregantes, cargas, diluyentes, sabores, colorantes, lubricantes, deslizantes, conservantes, sorbentes, edulcorantes, ácido linoleico conjugado (CLA), gelatina, cera de abejas, agua purificada, glicerol, cualquier tipo de aceite, incluidos, sin limitación, aceite de pescado o aceite de soja, o similares. Las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos/inmunoconjugados también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como, p. ej., polietilenglicoles.

Para la administración oral, los inmunoconjugados y anticuerpos pueden formularse fácilmente combinando estos inmunoconjugados/anticuerpos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los inmunoconjugados de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lodos, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener añadiendo un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas tales como azúcares, que incluyen, pero no limitados a, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, pero no limitadas a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como, pero no limitados a, la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se pueden proporcionar con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar disoluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis anticuerpos/inmunoconjugados.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen, pero no están limitadas a, cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con un relleno tal como, p. ej., lactosa, aglutinantes tales como, p. ej., almidones y/o lubricantes tales como, p. ej., talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los inmunoconjugados/anticuerpos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de, p. ej., comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en la forma de presentación de un pulverizador en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de acuerdo con un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para usar en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo de los inmunoconjugados/anticuerpos y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, las composiciones de la presente invención también pueden formularse como una preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular.

Las inyecciones de liberación lenta se pueden administrar a intervalos de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 meses o más. Así, por ejemplo, los inmunoconjugados/anticuerpos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

En la administración transdérmica, las composiciones de la presente invención, por ejemplo, pueden aplicarse a un apósito, o pueden aplicarse mediante sistemas terapéuticos transdérmicos que, por consiguiente, se suministran al organismo.

Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar en combinación con otros ingredientes activos, tales como, por ejemplo, adyuvantes, inhibidores de proteasas u otros fármacos o compuestos compatibles donde se considera que dicha combinación es deseable o ventajosa para lograr los efectos deseados de los métodos descritos en la presente memoria.

5 En algunas realizaciones, el componente disgregante comprende uno o más de croscarmelosa de sodio, carmelosa de calcio, crospovidona, ácido alginico, alginato de sodio, alginato de potasio, alginato de calcio, una resina de intercambio iónico, un sistema efervescente basado en ácidos alimentarios y un componente de carbonato alcalino, arcilla, talco, almidón, almidón pregelatinizado, glicolato de sodio de almidón, flóculo de celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, silicato de calcio, un carbonato metálico, bicarbonato de sodio, citrato de calcio o fosfato de calcio.

En algunas realizaciones, el componente diluyente comprende uno o más de manitol, lactosa, sacarosa, maltodextrina, sorbitol, xilitol, celulosa en polvo, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, almidón, glicolato de sodio de almidón, almidón pregelatinizado, un fosfato de calcio, un carbonato metálico, un óxido metálico o un aluminosilicato metálico.

15 En algunas realizaciones, el componente lubricante opcional, cuando está presente, comprende uno o más de ácido esteárico, estearato metálico, estearil fumarato de sodio, ácido graso, alcohol graso, éster de ácido graso, behenato de glicerilo, aceite mineral, aceite vegetal, parafina, leucina, sílice, ácido silícico, talco, éster de ácido graso de propilenglicol, aceite de ricino polietoxilado, polietilenglicol, polipropilenglicol, polialquilenglicol, éster graso de polioxietilenglicerol, éter de alcohol graso de polioxietileno, esteroles polietoxilados, aceite de ricino polietoxilado, aceite vegetal polietoxilado o cloruro de sodio.

Ejemplos

Ejemplo 1: método de mapeo de los epítomos de células T en los dominios V_H y V_L del fragmento de anticuerpo EpCAM.

Las secuencias de los dominios V_H-C_H y V_L-C_L del fragmento de anticuerpo EpCAM no desinmunizado (Fab) VB5-845-WT están representadas por las SEQ ID NO: 5 y 6, y también se han descrito en la patente de EE. UU. 7.339.031, que se incorpora en la presente memoria como referencia. El análisis de las secuencias usando iTope™ se realizó con 9mers superpuestos que abarcan las proteínas que se ensayaron frente a cada uno de los 34 alelos de MHC de clase II. Cada 9mer se calificó en función del 'ajuste' potencial y de las interacciones con las moléculas de MHC de clase II. Las puntuaciones de péptidos calculadas por el software se encuentran entre 0 y 1. Se destacaron los péptidos que produjeron una puntuación de unión media alta ($> 0,55$ en la función de puntuación iTope™). Si $\geq 50\%$ de los péptidos de unión a MHC de clase II (es decir, 17 de 34 alelos) tenían una alta afinidad de unión (puntuación $> 0,6$), dichos péptidos se definieron como péptidos de unión a MHC de clase II "promiscuos de afinidad alta". Los péptidos de unión a MHC de clase II que se unían a $\geq 50\%$ de los alelos con una puntuación $> 0,55$ se definieron como "promiscuos de afinidad moderada". Las secuencias también se usaron para interrogar al TCED™ mediante búsqueda BLAST con el fin de identificar cualquier homología de secuencia alta con epítomos de células T previamente identificados.

El dominio V_H-C_H no desinmunizado se designa como V_H-C_H de tipo salvaje (WT) (SEQ ID NO: 5) y el dominio V_H-C_H desinmunizado se designa como V_L-C_L desinmunizado (DI) (SEQ ID NO: 1). Del mismo modo, el dominio V_L-C_L no desinmunizado se designa como V_L-C_L de tipo salvaje (WT) (SEQ ID NO: 6) y el dominio V_L-C_L desinmunizado se designa como V_L-C_L desinmunizado (DI) (SEQ ID NO: 2). Los análisis de péptidos del dominio variable solamente- V_H -WT, V_H -DI, V_L -WT y V_L -DI se muestran en las Fig. 2-6. La Tabla 1 muestra los aminoácidos mutados requeridos para generar V_H -DI. La Tabla 2 muestra los ácidos mutados requeridos para generar V_L -DI.

TABLA 1

Epítopo	Aminoácidos WT	Aminoácidos mutados	Epítopo eliminado (In Silico)	Comentarios
2-11 4-13 5-14 12-21 18-27	Q6, P9, V18, V20	E6, G9, L18, L20	Sí Sí Sí Sí Sí	
32-41 36-45	N31, K38	A31, R38	No Sí	El residuo N35 crítico para la unión, no pudo ser mutado
48-57 50-59	M48, W50		No No	El residuo Y53 crítico para la unión, no pudo ser mutado
63-72	F63, F69, L71, A75, S76, A77	V63, I69, A71, K75, N76, T77	No	* Cambio al marco 4D5 y la presencia del epítopo se debe al análisis demasiado predictivo del análisis in silico
79-88 80-89	I82	M82	Sí	
89-98	Y91, A93, I97		No	Los residuos Y91, A93 e I97 críticos para la unión, no pudieron ser mutados
108-117	L109	V109	Sí	
Total: 14			Total: 4 *	

TABLA 2

Epítopo	Aminoácidos WT	Aminoácidos mutados	Epítopo eliminado (In Silico)	Comentarios
2-11 4-13 5-14 12-21 18-27	Q6, P9, V18, V20	E6, G9, L18, L20	Sí Sí Sí Sí Sí	
32-41 36-45	N31, K38	A31, R38	No Sí	El residuo N35 crítico para la unión, no pudo ser mutado
48-57 50-59	M48, W50		No No	El residuo Y53 crítico para la unión, no pudo ser mutado
63-72	F63, F69, L71, A75, S76, A77	V63, I69, A71, K75, N76, T77	No	* Cambio al marco 4D5 y la presencia del epítopo se debe al análisis demasiado predictivo del análisis in silico
79-88 80-89	I82	M82	Sí	
89-98	Y91, A93, I97		No	Los residuos Y91, A93 e I97 críticos para la unión, no pudieron ser mutados
108-117	L109	V109	Sí	
Total: 14			Total: 4 *	

Se ensayaron otras mutaciones, pero no se enumeran en las tablas anteriores, porque no se expresaron o fallaron en los estudios de unión.

Ejemplo 2: preparación de VB5-845 desinmunizado

Mientras que las mutaciones de Fab se evaluaron in silico con la molécula VB5-845, la caracterización biológica se realizó usando tanto el Fab desinmunizado solo como una proteína de fusión que contenía el fragmento Fab desinmunizado fusionado con la carga útil de la toxina de DeBouganina en el extremo C de la cadena ligera. La carga útil de la toxina deBouganina (SEQ ID NO: 4) se usó como una etiqueta para el estudio de citometría de flujo y como una etapa de captura para la cuantificación por ELISA del sobrenadante inducido.

Los fragmentos 845 V_H y V_L mutados se generaron mediante el método de PCR de Empalme por Extensión de Solapamiento, SOE-PCR usando los cebadores correspondientes. Cada fragmento V_H y V_L se clonó en el vector pCR 2.1 y se transformó en células de *E. coli* 10F para la secuenciación. El plásmido pCR 2.1 que contenía el inserto correcto se digirió con un conjunto identificado de enzimas de restricción, específicas bien para V_H o V_L.

El fragmento V_H se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacII* y se ligó con el fragmento *SacII*-C_H-V_L-C_L-de-Boug-*XhoI* en el vector pING3302, digerido previamente con *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron con la reacción de ligación y se creció una colonia transformada para la expresión a pequeña escala.

El fragmento V_L, digerido con las enzimas de restricción *Sall* y *BsmI*, se ligó con el plásmido VB6-845/pSP73, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. La reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* 10F y, después de la selección con ampicilina, el plásmido VB6-845/pSV73 se extrajo de una colonia cultivada durante la noche. El inserto VB6-845 se obtuvo con la combinación de las enzimas de restricción *Scal*, *EcoRI* y *XhoI* y se ligó en el vector pING3302, digerido previamente con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron entonces con la reacción de ligación VB6-845/3302 y se creció una colonia transformada para la expresión a pequeña escala.

Para combinar las cadenas mutadas, los fragmentos V_H y V_L se digirieron con *EcoRI*-*SacII* y *SacII*-*XhoI*, respectivamente, y se ligaron en presencia del plásmido pING3302, digerido previamente con *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron con la reacción de ligación VB6-845 V_H+V_L/3302 y se creció una colonia transformada para la expresión a pequeña escala.

Ingeniería de la variante VB5-845-DI

El VB5-845 DI está representado por un dominio de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19; y un dominio de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 20. La variante VB5-845-DI se preparó por ingeniería usando el sitio de restricción único *BssSI* presente en la cadena C_L kappa. El fragmento 845 *EcoRI*-V_H-C_H-V_L-C_L-*BssSI* se ligó con el fragmento *BssSI*-C_L kappa-*XhoI* en el plásmido pING3302, digerido previamente con *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron con la reacción de ligación para la secuenciación y la expresión a pequeña escala.

Expresión a pequeña escala

Las células 10F transformadas que contenían la variante VB5-845-DI/plásmido 3302 se inocularon en 5 mL de 2-YT que contenían 25 µg/mL de tetraciclina y se incubaron a 37 °C con agitación constante a 225 rpm. Después de 16 horas de incubación, se inocularon 300 µL de cultivo de siembra de toda la noche en 30 mL de TB (1% de inóculo), y se incubaron a 37 °C con agitación constante a 225 rpm hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 2,0. El cultivo se indujo con 150 µL de L-Arabinosa (0,1% final), y se incubó a 25 °C con agitación constante a 225 rpm. A las 16 horas después de la inducción, se recogió el sobrenadante del cultivo para su análisis mediante transferencia Western, ELISA y citometría de flujo.

Expresión de VB5-845-DI a escala de 15 L

El cultivo en Medios Mínimo de Glicerol (GMM) de células de *E. coli* E104 transformadas se realizó en un biorreactor de 20 L a 28 °C, flujo de aire y agitación de 10 SLPM y 1.000 RPM, respectivamente, y un pH de 7,0 mantenido con hidróxido de amonio. Brevemente, se inocularon 15 L de GMM con 150 mL de cultivo de siembra cultivado en GMM que contenía 25 µg/mL de tetraciclina hasta una DO₆₀₀ de 2,0-2,5 en un incubador con agitación ajustado a 26 °C y 200 RPM. En el biorreactor de 20 L, un aumento en el oxígeno disuelto (OD) a ≥ 90% desencadenó la alimentación con glicerol al 50% a través del bucle de pO₂ en un punto de ajuste de OD del 40%, para controlar la tasa de crecimiento. A una DO₆₀₀ de 50, se indujo el cultivo con una alimentación de glicerol al 50% que contenía L-arabinosa usando la misma estrategia de alimentación. Después de 40 horas de inducción, el sobrenadante que contenía VB5-845-DI se clarificó por centrifugación seguido de microfiltración, se concentró y se diafiltró frente a tampón NaPO₄ 20 mM, pH 7,0.

Purificación de un lote de 15 L

Todas las columnas de cromatografía fueron empaquetadas en carcasas de columnas reutilizables de GE healthcare y despirogenadas haciendo fluir NaOH 1 N a través de las columnas durante 35 minutos y lavadas con WFI hasta que el pH del efluente de la columna fue <pH 8,0.

- 5 El punto isoelectrico teórico de VB5-845 desinmunizado es 8,65. El pH del sobrenadante del cultivo diafiltrado se ajustó a pH 6,2 para la unión a una columna de intercambio catiónico débil (p. ej., CM sefarosa preparada según las instrucciones del fabricante) que se equilibró previamente con tampón NaPO₄ 20 mM, tampón NaCl 25 mM pH 6,2. Después de cargar, la columna se lavó a la línea de base UV 280 nm con tampón de equilibrado y el VB5-845-DI unido se eluyó aumentando el pH y el NaCl del tampón de equilibrado a tampón NaPO₄ 20 mM, tampón NaCl 150 mM pH 7,5.

- 10 El pico del producto recogido en la etapa anterior se diluyó 3 veces con tampón NaPO₄ 20 mM, pH 7,0 y el pH final de la disolución diluida se ajustó a pH 7,5 antes de la aplicación en una columna de intercambio aniónico (p. ej., Q-sefarosa preparada según las instrucciones del fabricante) operada en modo de flujo continuo. La columna se equilibró con tampón NaPO₄ 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5. El pH del flujo saliente de la columna y lavado combinados se ajustó a pH 6,0 para su aplicación en la tercera columna.

- 15 La muestra combinada se hizo fluir entonces a través de una columna de intercambio catiónico (p. ej., SP sefarosa preparada según las instrucciones del fabricante) previamente equilibrada con tampón NaPO₄ 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0 y se recogió el efluente que contenía el producto. El pH del efluente se ajustó a pH 7,5 y se esterilizó por filtración para almacenamiento a largo plazo a 4 °C y -20 °C.

- 20 El nivel de expresión de la construcción VB5-845-DI se estimó mediante análisis por transferencia Western. Brevemente, se cargaron 16 µL de sobrenadante de cultivo inducido y 4 µL de tampón de muestra LDS en un gel NuPAGE Bis-Tris al 10%. El gel se transfirió entonces a una membrana de nitrocelulosa a 40 V durante 1 hora. Después de bloquear y lavar la membrana, se detectó la proteína VB5-845-DI usando un anticuerpo anti-kappa-peroxidasa de rábano (1/1.000) durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se reveló usando DAB, y el nivel de expresión de las construcciones VB5-845-DI se comparó con VB6-845 y VB5-845-WT. La especificidad de las bandas detectadas se confirmó usando sobrenadante de *E. coli* no inducida.

- 25 Se usó un ELISA para cuantificar la proteína VB6-845 presente en los sobrenadantes de cultivo inducidos. Brevemente, una placa Immunolon 1B se recubrió con 10 µg/mL de anti-bouganina de conejo y se incubó durante la noche a 4 °C. Después de lavar y bloquear la placa, los sobrenadantes de las variantes VB6-845, diluidos 1/320, 1/640 y 1/1.280, así como una curva estándar preparada a partir del anticuerpo VB6-845-WT purificado (25 ng/mL-0,195 ng/mL), se añadieron a la placa y se incubaron durante 2 horas a 22 °C. La proteína VB5-845-DI unida se detectó usando un anticuerpo anti-kappa-peroxidasa de rábano (1/1.000) durante 1 hora a 22 °C. La placa se reveló usando TMB. Los sobrenadantes de cultivo de VB6-845-WT e inducidos por el plásmido pING3302 se usaron como un control positivo y negativo, respectivamente.

- 35 Ejemplo 3: ensayos de unión *in vitro*

- La unión de los fragmentos de anticuerpos VB5-845 desinmunizados (VB5-845-DI) y VB5-845 no desinmunizados (VB5-845-WT) se evaluó en la línea celular de cáncer CAL-27 mediante citometría de flujo. Las variantes VB5-845 purificadas (DI y WT) se incubaron a 1 µg/mL con 0,3 x 10⁶ células tumorales durante 2 horas en hielo. Después de lavar con PBS-FBS al 5%, se añadió un anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG humana (H&L) (1/200) a las células y se incubó durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron con PBS-FBS al 5% y se añadió estreptavidina-cychrome durante 30 minutos en hielo para detectar las proteínas VB5-845 unidas a las células (FIG. 7).

- La FIG. 8 muestra la unión dependiente de la dosis de VB5-845-DI a la línea celular de carcinoma de células escamosas H&N positivas para EpCAM Cal-27. No se observó unión frente al melanoma A375 negativo para EpCAM. La unión se expresa como las veces de aumento medio de la fluorescencia media sobre el control de PBS por citometría de flujo.

- 45 Ejemplo 4: afinidad de unión

- La citometría de flujo se usó para medir la afinidad de unión de VB5-845-WT y VB5-845-DI. Brevemente, las proteínas VB5-845 se incubaron a concentraciones que variaban de 3,2 ng/mL a 1.000 ng/mL con 0,2 x 10⁶ células CAL 27 en hielo durante 2 horas. Después de lavar con PBS-FBS al 5%, se añadió un anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG humana y se incubó durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron con PBS-FBS al 5% y se añadió estreptavidina-cychrome durante 30 minutos en hielo para detectar VB5-845 unido a las células. Los valores y el análisis gráfico se generaron usando Sigma Plot (Jandel Scientific, San Rafael, CA). La inversa de la fluorescencia media determinada se representó como una función de la inversa de la concentración de anticuerpo para determinar KD por el método de Lineweaver-Burk. Se generó un gráfico y se calculó la KD a partir de la pendiente de la curva. La constante de disociación, valor KD, se determinó mediante la siguiente ecuación: $1/F = 1/F_{\text{máx}} + (KD/F_{\text{máx}}) (1/F_{\text{ab}})$, donde F = fluorescencia mediana de fondo restada y F_{máx} se calculó a partir de la gráfica (FIG. 9)

Ejemplo 5: ensayos de competición

La capacidad de las variantes VB5-845 (VB5-845-DI y VB5-845-WT) para competir con VB6-845 para unirse a las células tumorales CAL 27 se determinó por citometría de flujo. VB6-845 es un inmunoconjugado unido a toxina de bouganina desimmunizada y se ha descrito en la Patente de EE.UU. No. 7.339.031 y se incorpora en la presente memoria por referencia. Las variantes de VB5-845 y VB6-845 se incubaron conjuntamente en 150 μ L con $0,2 \times 10^6$ células tumorales durante 2 horas en hielo. La concentración de VB6-845 se mantuvo constante a 1 μ g/mL mientras que la concentración de las variantes de VB5-845 se incrementó de 781 ng/mL a 25 μ g/mL. La VB6-845 unida en la superficie celular se detectó con un anticuerpo anti-de-bouganina de ratón seguido de un H&L antiraton de cabra acoplado a FITC (FIG. 10).

Ejemplo 6: análisis EpiScreen de clones de tipo salvaje vs. clones desimmunizados

Preparación y selección de donantes de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de capas leucoplaquetarias de donantes de la comunidad sana (de sangre extraída en 24 horas) obtenidas del Servicio Nacional de Transfusión de Sangre del Reino Unido (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Reino Unido) y de acuerdo con la aprobación otorgada por el Comité de Ética de Investigación Local del Addenbrooke's Hospital. Las PBMC se aíslan de las capas leucoplaquetarias mediante centrifugación de densidad Lymphoprep (Axis-shield, Dundee, Reino Unido) y las células T CD8+ se deplecionan usando CD8+ RosetteSep™ (StemCell Technologies Inc, Londres, Reino Unido). Los donantes se caracterizan mediante la identificación de los haplotipos HLA-DR usando un kit de tipificación de tejidos basado en HLA SSP-PCR (Biotest, Solihull, Reino Unido). También se determinan las respuestas de las células T a un antígeno control (hemocianina de lapa (KLH), [Pierce (Perbio), Cramlington, Reino Unido]), así como péptidos derivados de los virus de la gripe A y Epstein Barr. Las PBMC se congelan y almacenan entonces en nitrógeno líquido hasta que se requieran.

Se selecciona una cohorte de 51 donantes para representar mejor el número y la frecuencia de los alotipos HLA-DR expresados en la población mundial. El análisis de los alotipos expresados en la cohorte frente a los expresados en la población mundial revelará que se alcanza una cobertura de >80% y que todos los alotipos principales de HLA-DR (alotipos individuales con una frecuencia >5% expresados en la población mundial) están bien representados.

Ensayos de la evolución temporal de la proliferación de las células T EpiScreen™

Las PBMC de cada donante se descongelan, se cuentan y se evalúa la viabilidad. Las células se reviven medio de cultivo AIM-VR a temperatura ambiente, se lavan y se resuspenden en AIM-VR a $4-6 \times 10^6$ PBMC/ml. Para cada donante, se establecen cultivos a granel en los que se añade 1 mL de preparación madre de células de proliferación a los pocillos apropiados de una placa de 24 pocillos. Se añaden 0,5 mL de medio de cultivo y 0,5 mL de cada muestra diluida a las PBMC para proporcionar una concentración final de 0,3 μ M. Para cada donante, también se incluye un control de reproducibilidad (células incubadas con 100 μ g/ml de KLH), un control positivo (células incubadas con 25 μ g/ml de PHA) y un pocillo solo con medio de cultivo. Los cultivos se incuban durante un total de 8 días a 37 °C con CO₂ al 5%. En los días 5, 6, 7 y 8, las células en cada pocillo se resuspenden suavemente, y se transfieren 3 x 100 μ L partes alícuotas a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Los cultivos se pulsan con 0,75 μ Ci [³H]-Timidina (Perkin ElmerR, Beaconsfield, Reino Unido) en 100 μ L de medio de cultivo AIM-VR y se incuban durante 18 horas más antes de recoger sobre rejillas de filtro (Perkin ElmerR) usando un recolector de células Skatron Micro 96S - 10056. Las cuentas por minuto (cpm) para cada pocillo se determinan mediante conteo de centelleo Meltilex™ (Perkin ElmerR) en un contador de centelleo líquido 1450 Microbeta Wallac Trilux (Perkin ElmerR) en paralux, conteo de fondo bajo.

Ensayos ELISpot de IL-2 EpiScreen™

También se usaron donantes idénticos a los usados en el ensayo de proliferación para el ensayo ELISpot de IL-2. Las células se descongelan y reviven como se ha descrito anteriormente. Las placas ELISpot (Millipore, Watford, Reino Unido) se humedecen previamente y se recubren durante la noche con 100 μ L/pocillo de muestra de captura de IL-2 (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) en PBS. Las placas se lavan entonces 3 veces en PBS, se incuban durante la noche en tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS) y se lavan en medio AIM-VR. La densidad celular para cada donante se ajusta a $4-6 \times 10^6$ PBMC/ml en medio de cultivo AIM-VR y se añaden 100 μ L de células a cada pocillo. Se añaden 50 μ L de muestras y controles a los pocillos apropiados, así como 50 μ L de AIMV para llevar el volumen total a 200 μ L/pocillo. Las muestras se ensayan en cultivos sextuplicados y, para cada donante, también se incluyen en cada placa un control negativo (medio AIMV R solo), control sin células y un control positivo con mitógeno (PHA a 2,5 μ g/ml - usado como ensayo interno para la función ELISpot y la viabilidad celular). Después de un período de incubación de 8 días, las placas ELISpot se revelan mediante lavado secuencial en dH₂O y PBS (x3) antes de la adición de 100 μ L de muestra de detección biotinilada filtrada (R&D Systems) en PBS/BSA al 1%. Después de la incubación a 37 °C durante 1,5 horas, las placas se lavan adicionalmente en PBS (x3) y se añaden 100 μ L de estreptavidina-AP filtrada (R&D Systems) en PBS/BSA al 1% durante 1,5 horas (incubación a temperatura ambiente). La estreptavidina-AP se desecha y las placas se lavan en PBS (x4). Se añaden 100 μ L de sustrato BCIP/NBT (R&D Systems) a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado de las manchas se detiene lavando los pocillos y la parte posterior de los pozos tres veces con dH₂O. Las placas secas se escanean en

un analizador ImmunoscanR y las manchas por pocillo (spw) se determinan usando el software ImmunoscanR versión 4.

Análisis de los datos de EpiScreen™

Para los ensayos de proliferación y ELISpot de IL-2, se ha establecido previamente un umbral empírico de un índice de estimulación (SI) igual a o mayor de 2 ($SI \geq 2,00$), por lo que las muestras que inducen respuestas por encima de este umbral se consideran positivas (los SI límite $\geq 1,90$ también están resaltados). El extenso desarrollo de ensayos y estudios previos han demostrado que este es el umbral mínimo de señal a ruido que permite la máxima sensibilidad sin detectar grandes números de respuestas falsas positivas u omitir eventos inmunogénicos sutiles. Para ambos conjuntos de datos de proliferación ($n=3$) y ELISpot de IL-2 ($n=6$), las respuestas positivas se definen por umbrales estadísticos y empíricos de la siguiente manera: (1) Significancia ($p < 0,05$) de la respuesta al comparar cpm o spw de los pocillos de ensayo frente a pocillos control de medio usando el ensayo de la *t* de Student de dos muestras no emparejadas; (2) Índice de estimulación mayor de o igual a 2 ($SI \geq 2,00$), donde $SI = \text{media de los pocillos de ensayo (cpm o spw)} / \text{línea de base (cpm o spw)}$. Los datos presentados de esta manera se indican como $SI > 2,00$, $p < 0,05$. Además, la variación intraensayo se evalúa calculando el coeficiente de varianza y la desviación estándar (SD) de los datos brutos de los cultivos replicados.

Ejemplo 7: ingeniería molecular y expresión de VB6-845 desinmunizado (clon Algo)

Diseño experimental

Ingeniería de variantes de VB6-845

Los fragmentos 845 V_H y V_L mutados se generaron mediante el método de PCR de Empalme por Extensión de Solapamiento, SOE-PCR. Cada fragmento V_H y V_L se clonó en el vector pCR 2.1 y se transformó en células de *E. coli* 10F para la secuenciación. El plásmido pCR 2.1 que contenía el inserto correcto se digirió con un conjunto identificado de enzimas de restricción, específicas bien para V_H o V_L .

El fragmento V_H se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacII* y se ligó con el fragmento *SacII*- C_H - V_L - C_L -de-Boug-*XhoI* en el vector pING3302, digerido previamente con *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron con la reacción de ligación y se creció una colonia transformada para la expresión a pequeña escala.

El fragmento V_L , digerido con las enzimas de restricción *Sall* y *BsmI*, se ligó con el plásmido VB6-845 pSV73, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. La reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* 10F y, después de la selección con ampicilina, el plásmido VB6-845/pSV73 se extrajo de una colonia cultivada durante la noche. El inserto VB6-845 se obtuvo con la combinación de enzimas de restricción *Scal*, *EcoRI* y *XhoI* y se ligó en el vector pING3302, digerido previamente con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron entonces con la reacción de ligación VB6-845/3302 y se creció una colonia transformada para la expresión a pequeña escala.

Para combinar las cadenas mutadas, los fragmentos V_H y V_L se digirieron con *EcoRI* - *SacII* y *SacII* - *XhoI*, respectivamente, y se ligaron en presencia del plásmido pING3302, digerido previamente con *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron con la reacción de ligación VB6-845 V_H+V_L /3302 y se creció una colonia transformada para la expresión a pequeña escala.

Ingeniería de VB5-845 Algo

El VB5-845-Algo Fab está representado por un dominio de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 23; y un dominio de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 24. El VB5-845-Algo fue preparado por ingeniería usando el sitio de restricción único *BssSI* presente en la cadena C_L kappa. El fragmento 845 *EcoRI*- V_H - C_H - V_L - C_L -*BssSI* se ligó con el fragmento *BssSI*- C_L kappa-*XhoI* en el plásmido pING3302, digerido previamente con *EcoRI* y *XhoI*. Las células de *E. coli* 10F químicamente competentes se transformaron con la reacción de ligación para la secuenciación y la expresión a pequeña escala.

Expresión a pequeña escala

Las células 10F transformadas que contenían bien el plásmido VB6-845-Algo/3302 o el plásmido VB5-845-Algo/3302 se inocularon en 5 mL de 2-YT que contenía 25 µg/mL de tetraciclina y se incubaron a 37 °C con agitación constante a 225 rpm. Después de 16 horas de incubación, se inocularon 300 µL de cultivo de siembra de toda la noche en 30 mL de TB (1% de inóculo), y se incubó a 37 °C con agitación constante a 225 rpm hasta que se alcanzó una DO_{600} de 2,0. El cultivo se indujo con 150 µL de L-Arabinosa (0,1% final), y se incubó a 25 °C con agitación constante a 225 rpm. A las 16 horas después de la inducción, se recogió el sobrenadante del cultivo para su análisis mediante transferencia Western, ELISA y citometría de flujo.

Análisis por transferencia Western

El nivel de expresión de VB6-845 y VB5-845-Algo se estimó mediante análisis por transferencia Western. Brevemente, se cargaron 16 µL de sobrenadante de cultivo inducido y 4 µL de tampón de muestra LDS en un gel NuPAGE Bis-Tris al 10%. El gel se transfirió entonces a una membrana de nitrocelulosa a 40 V durante 1 hora. Después de bloquear y lavar la membrana, se detectó la proteína VB6/VB5-845-Algo usando un anticuerpo anti-kappa-peroxidasa de rábano (1/1.000) durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se reveló usando DAB, y el nivel de expresión del VB6/VB5-845-Algo se comparó con los tipos salvajes (WT) VB6/VB5-845, respectivamente. La especificidad de las bandas detectadas se confirmó usando sobrenadante de *E. coli* no inducido.

Cuantificación por ELISA

Se usó un ELISA para cuantificar la proteína VB6-845 presente en los sobrenadantes de cultivo inducidos. Brevemente, una placa Immunolon1B se recubrió con 10 µg/ml de anti-bouganina de conejo y se incubó durante la noche a 4 °C. Después de lavar y bloquear la placa, los sobrenadantes VB6-845, diluidos 1/320, 1/640 y 1/1.280, así como una curva estándar preparada a partir del anticuerpo VB6-845 purificado (25 ng/mL-0,195 ng/mL), se añadieron a la placa y se incubaron durante 2 horas a 22 °C. La proteína VB6-845 unida se detectó usando un anticuerpo anti-kappa-peroxidasa de rábano (1/1.000) durante 1 hora a 22 °C. La placa se reveló usando TMB. Los sobrenadantes de cultivos inducidos por VB6-845-WT y el plásmido pING3302 se usaron como un control positivo y negativo, respectivamente.

Reactividad de unión medida por citometría de flujo

Sobrenadantes de cultivos inducidos por VB6-845: la reactividad de las construcciones VB6-845 se evaluó mediante citometría de flujo usando carcinoma de células escamosas humanas positivas para EpCAM CAL 27. Usando la cuantificación por ELISA, los volúmenes del sobrenadante inducido por VB6-845 se ajustaron a la concentración más baja y se incubaron con $0,2 \times 10^6$ células tumorales durante 2 horas en hielo. Después de lavar con PBS-FBS al 5%, se añadió un anticuerpo de conejo anti-bouganina (1/100) a las células y se incubó durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron con PBS-FBS al 5%, y se añadió un anticuerpo anti-conejo de cabra acoplado a FITC (1/100) durante 30 minutos en hielo para detectar la proteína VB6 unida a las células. Los sobrenadantes de cultivo inducidos por VB6-845-WT y el plásmido pING3302 se usaron como un control positivo y negativo, respectivamente.

VB5-845 purificado: la reactividad de unión de las variantes de VB5-845 purificadas a la línea celular tumoral CAL 27 se midió por citometría de flujo. Las variantes de VB5-845 purificadas se incubaron a 1 µg/mL con $0,3 \times 10^6$ células tumorales durante 2 horas en hielo. Después de lavar con PBS-FBS al 5%, se añadió un anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG humana (H&L) (1/200) a las células y se incubó durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron con PBS-FBS al 5% y se añadió estreptavidina-cychrome durante 30 minutos en hielo para detectar la proteína VB5 unida a las células. Se usó VB5-845-WT como un control positivo.

VB6-845 purificado: la reactividad de unión del VB6-845-Algo purificado a 100 ng/mL se midió como se ha descrito anteriormente. La citotoxicidad se midió con un ensayo MTS usando líneas celulares positivas y negativas para EpCAM. Se usó VB6-845-WT como un control positivo.

Afinidad de unión

Se usó citometría de flujo para medir la afinidad de unión del VB5-845-Algo. Brevemente, VB5-845-Algo se incubó a concentraciones que variaban de 3,2 ng/mL a 1.000 ng/mL con $0,2 \times 10^6$ células CAL 27 en hielo durante 2 horas. Después de lavar con PBS-FBS al 5%, se añadió un anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG humana (1/200) y se incubó durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron con PBS-FBS al 5% y se añadió estreptavidina-cychrome (1/120) durante 30 minutos en hielo para detectar VB5-845-Algo unido a las células. Los valores y el análisis gráfico se generaron usando Sigma Plot (Jandel Scientific, San Rafael, CA). La inversa de la fluorescencia mediana determinada se representó como una función de la inversa de la concentración de anticuerpo para determinar K_D por el método de Lineweaver-Burk. Se generó una gráfica y la K_D se calculó a partir de la pendiente de la curva. La constante de disociación, valor K_D , se determinó mediante la siguiente ecuación: $1/F = 1/F_{\text{máx}} + (K_D / F_{\text{máx}}) (1/F_{\text{ab}})$, donde F = fluorescencia mediana de fondo restada y $F_{\text{máx}}$ se calculó a partir de la gráfica.

Ensayo de competición con VB6-845 o VB5-845-WT

La capacidad del VB5-845-Algo para competir con VB6-845 por la unión a las células tumorales CAL 27 se determinó por citometría de flujo. VB5-845-Algo y VB6-845 se incubaron conjuntamente en 150 L con $0,3 \times 10^6$ células tumorales durante 2 horas en hielo. La concentración de VB6-845 se mantuvo constante a 1 µg/mL mientras que la concentración de VB5-845-Algo se incrementó de 17,8 µg/mL a 71 µg/mL. Las células se lavaron con PBS-FBS al 5%, y se añadió un anticuerpo de conejo anti-bouganina (1/100) a las células y se incubó durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS-FBS al 5%, se añadió un anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a FITC (1/100) durante 30 minutos en hielo para detectar la proteína VB6 unida a las células. Se usó VB4-845 como un control positivo para competir con VB6-845 por la unión a la línea celular tumoral CAL 27.

Estabilidad en suero

La estabilidad en suero de las variantes VB5-845 y VB6-845 se determinó mediante análisis por transferencia Western. Brevemente, se añadieron variantes a una concentración de 80 µg/mL en 500 µL de suero humano y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5% durante 24 horas. A las 0 horas, 3 horas, 6 horas y 24 horas, las muestras se agitaron con vórtex y se extrajo una parte alícuota de 45 µL y se almacenó a -20 °C en presencia de 15 µL de LDS. La transferencia Western se realizó como anteriormente, cargando 200 ng/pocillo de variante. Las proteínas VB5-845 o VB6-845 se detectaron usando un anticuerpo anti-4D5 de conejo (1/1.000) durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de un anticuerpo anti-conejo-peroxidasa de rábano (1/2.000) durante 45 minutos a temperatura ambiente. La membrana se reveló con DAB. Se usaron VB5-845 o VB6-845 purificados como controles positivos.

Termoestabilidad

Se usó citometría de flujo para determinar la termoestabilidad de las variantes VB5-845 y VB6-845. Las variantes VB5-845 y VB6-845 se añadieron a una concentración de 80 µg/mL en PBS y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5% durante 24 horas. A las 0 horas, 3 horas, 6 horas y 24 horas, se extrajo una parte alícuota de 25 µL y se almacenó a -20 °C para su análisis por citometría de flujo. Para el ensayo, las muestras de las variantes VB5-845 y VB6-845 se diluyeron a 1 µg/mL y 100ng/mL, respectivamente en 150 µL de PBS-FBS al 5% y se incubaron con 0,3 x 10⁶ células durante 2 horas en hielo. Después de lavar con PBS-FBS al 5%, se añadió un anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG humana (H + L) (1/200) y se incubó durante 1 hora en hielo. Después del lavado, se añadió estreptavidina fluorocromo PE-Cy5 (1/120) para detectar la unión a la superficie celular de VB5-845. Los VB5-845-WT y VB6-845-WT purificados se usaron como un control positivo.

Proliferación de células T de VB5-845-Algo

La capacidad de VB5-845-Algo y VB5-845 para inducir la proliferación de células T se midió mediante la selección de subpoblaciones CD3+CD4+ por citometría de flujo. La proliferación con o sin las proteínas Fab se analizó mediante la intensidad de fluorescencia de EdU-A488, un marcador de incorporación de ADN. Los datos se expresaron como índices de estimulación (valores SI) que corresponden a la proporción del número de linfocitos T CD3+CD4+ activados en los pocillos tratados con Fab frente a los no tratados.

Resultados

El análisis Epibase® identificó los epítomos de células T potenciales presentes en las cadenas pesadas y ligeras. Los cambios propuestos son aminoácidos que corresponden a las secuencias de la línea germinal y se clasificaron como "mutaciones seguras o de riesgo". Porque, de acuerdo con el número de cambios, no era factible evaluar el efecto de una única mutación puntual sobre la expresión y la actividad biológica. Por lo tanto, las mutaciones seguras se agruparon y se introdujeron con dos rondas consecutivas de SOE-PCR. Sin embargo, debido a la incertidumbre para las posiciones V_H38 y V_L50, se crearon cadenas que contenían bien residuos mutados o de tipo salvaje. Una vez que se verificaron las secuencias, las cadenas mutadas se clonaron en la unidad dicistrónica VB6-845 y se expresaron en presencia de su respectivo equivalente de tipo salvaje. Si el nivel de expresión y la actividad biológica eran comparables a WT, entonces las cadenas pesadas y ligeras mutadas se combinaron y ensayaron. Para las "mutaciones de riesgo", V_H53, V_H93 y V_H98 se evaluaron en primer lugar como una única mutación puntual. Si se determina adecuado, se incorporaron entonces dentro de la construcción final V_H.

Ingeniería molecular de la primera generación de VB6-845

1) Ingeniería y ensayo de la primera versión de VB6-845 de las "mutaciones seguras":

V_H-algo: se requirieron dos rondas sucesivas de SOE-PCR para introducir todas las mutaciones. Como se ve en la Tabla 3, el clon V_n-Ir contenía el FR1 y parte de las mutaciones FR3. El molde V_n-Ir se empleó entonces en la siguiente reacción de SOE-PCR para crear V_H-IIr que contiene todas las mutaciones y en el caso de V_H-IIr-K38, la posición 38 no cambió. La reacción de secuenciación realizada en la reacción final de SOE-PCR también reveló que uno de los clones secuenciados, llamado IIr-CDR1, contiene todos los aminoácidos mutados, excepto la región CDR1 y FR2. El nivel de expresión de las cadenas pesadas mutadas en presencia de la cadena ligera WT fue similar al WT. Además, la actividad biológica, medida por citometría de flujo, no se modificó en comparación con WT. Es destacable que la fluorescencia mediana más alta obtenida con algunas de las variantes podría ser el resultado de la subestimación de la concentración obtenida por ELISA.

Tabla 3: mutaciones de VH-algo y actividad biológica

clon	FR1	CDR1	FR2	FR3	FR4	ELISA (µg/mL)	MF
WT	V5	N31-N35	K38	T68-S74-A75-A77-N82a-A84	L10 9	1,9	100
Ir	Q5	N31-N35	K38	E68 -S74-A75-A77- Q82a-E84	L10 9	1,5	123
IIr	Q5	A31-S35	R38	E68-H74-N75-S77-Q82a-E84	V10 9	1,3	117
IIr-K38	Q5	A31-S35	K38	E68-H74-N75-S77-Q82a-E84	V10 9	1,4	120
IIr-CDR1	Q5	N31-N35	K38	E68-H74-N75-S77-Q82a-E84	V10 9	1,7	141

Los aminoácidos en negrita corresponden a los residuos mutados. La fluorescencia mediana reportada, MF, es un promedio de dos experimentos independientes y se expresa como % de WT. Número según la nomenclatura de Kabat.

- 5 V_L-Algo: las cadenas ligeras que contienen las mutaciones CDR1/A50-CDR2/FR4 o CDR1/Q50-CDR2/FR4 se introdujeron mediante la primera reacción de SOE-PCR. En contraste con la estrategia de V_H, se preparó por ingeniería una construcción que contenía solo las mutaciones FR2 y se ensayó por separado. La actividad biológica del clon Ir-A50 disminuyó significativamente, lo que demuestra que la mutación A50 era perjudicial para la unión de VB6-845 a EpCAM. Como consecuencia, las mutaciones de FR2 solo se añadieron a la cadena ligera Ir-Q50. Cuando se ensayó, el nivel de expresión y actividad biológica de IIr-Q50 fue un 70 y 44% más bajo que el de WT, respectivamente. Es destacable que el nivel de expresión y la actividad biológica se restauraron solo parcialmente invirtiendo la posición 41 al aminoácido WT.

Tabla 4: mutaciones de VL-algo y actividad biológica

Clon	CDR1	FR2	CDR2	FR4	ELISA (µg/ml)	MF
WT	R24	G41-K42	Q50-M51-N53-A55	L106	1,47	100
Ir-A50	K24	G41-K42	A50-A51-S53-Q55	I106	1,42	20
Ir-Q50	K24	G41-K42	Q50- A51-S53-Q55	I106	1,15	93
FR2	R24	D41-Q42	Q50-M51-N53-A55	L106	0,91	84
IIr-Q50	K24	D41-Q42	Q50- A51-S53-Q55	I106	0,44	56

- 15 Los aminoácidos en negrita corresponden a los residuos mutados. La fluorescencia mediana reportada, MF, es un promedio de dos experimentos independientes y se expresa como % de WT. Numerados según la nomenclatura de Kabat.

20 V_H-V_L-algo: En base a los resultados descritos anteriormente, se seleccionaron V_H-IIr y V_L-Ir-Q50, se combinaron y se expresaron como una proteína de fusión recombinante VB6-845. Como se ve en la Tabla 5, más del 66% de la actividad biológica se perdió, lo que sugiere que algunas mutaciones han afectado la interfaz V_H-V_L. Para determinar el área problemática, V_H-Ir y V_H-IIr-CDR1 también se prepararon por ingeniería en presencia de V_L-Ir-Q50 y se ensayaron. La actividad biológica de VB6-845-(V_H-IIr-CDR1/V_L-Ir-Q50) se restauró parcialmente, lo que sugiere que las mutaciones dentro de las regiones CDR1 pueden haber alterado en parte la interfaz V_H-V_L.

Tabla 5: Ensayo de V_H-V_L Algo

V _H	V _L	ELISA (µg/ml)	MF
WT	WT	1,56	100
IIr	Ir-Q50	1,2	34
Ir	Ir-Q50	1,46	82
IIr-CDR1	Ir-Q50	2,05	78

- 25 La fluorescencia mediana reportada, MF, es un promedio de dos experimentos independientes y se expresa como % de WT.

2) Ingeniería y ensayo de las "mutaciones de riesgo" de VB6-845

- 30 Las construcciones VB6-845 que contienen una única mutación puntual "de riesgo" fueron preparadas por ingeniería por SOE-PCR y se ensayaron. Como se ve en la Tabla 6, solo la posición K98Q no afectó la actividad biológica.

Tabla 6: V_H Algo, "mutaciones de riesgo" y actividad biológica

clon	CDR2	FR3	CDR3	ELISA (µg/ml)	MF
WT	Y53	A93	K98	3,2	100
V _H -N53	N53	A93	K98	4,0	23
V _H -S93	Y53	S93	K98	2,7	35
V _H -Q98	Y53	A93	Q98	3,2	108

La fluorescencia mediana reportada, MF, es un promedio de dos experimentos independientes y se expresa como % de WT. Numerados según la nomenclatura de Kabat.

5 3) Ingeniería y ensayo de la segunda versión de VB6-845

Sobre la base de los resultados descritos anteriormente, se realizaron algunos ajustes. Para el dominio V_H, la posición 35 se invirtió a WT. Para el dominio V_L, la dificultad de mutar el FR2 y la posición 50 condujo a un conjunto diferente de mutaciones para las regiones FR2 y CDR2.

- 10 V_H-algo, segunda versión: la posición 35 se invirtió en un residuo de asparagina usando el inserto Ilr como un molde en la reacción de SOE-PCR. Como se esperaba, no se observaron diferencias en el nivel de expresión o la actividad biológica cuando se preparó por ingeniería con la cadena ligera de tipo salvaje (Tabla 7). De manera similar, la adición de la mutación CDR3, Q98 al Ilr-N35 no alteró la expresión o la actividad biológica.

Tabla 7: segunda versión de V_H-algo, mutaciones y actividad biológica

clon	FR1	CDR1	FR2	FR3	CDR 3	FR4	ELISA (µg/mL)	MF
WT	V5	N31-N35	K38	T68-S74-A75-A77-N82a-A84	K98	L109	1,2	100
Ilr	Q5	A31-S35	R38	E68-H74-N75-S77-Q82a-E84	K98	V109	1,35	72
Ilr-CDR1	Q5	N31-N35	K38	E68-H74-N75-S77-Q82a-E84	K98	V109	1,23	117
Ilr-N35	Q5	A31- N35	R38	E68-H74-N75-S77-Q82a-E84	K98	V109	1,2	109
Ilr-N35-Q98	Q5	A31-N35	R38	E68-H74-N75-S77-Q82a-E84	Q98	V109	1,2	100

- 15 Los aminoácidos en negrita corresponden a los residuos mutados. La fluorescencia mediana reportada, MF, es un promedio de dos experimentos independientes y se expresa como % de WT. Numerados según la nomenclatura de Kabat.

- 20 V_L-algo, segunda versión: ambas cadenas ligeras que contienen bien las mutaciones FR2 (H39-S42) o CDR2 (E51-H53-Q55) mostraron una unión disminuida cuando se ensayaron como una molécula VB6-845. Este efecto se amplificó aún más cuando se combinó con las mutaciones CDR1 y FR4 como una construcción V_L final (Ilr/FR2/CDR2). Es destacable que también es posible que las mutaciones de la cadena ligera solo sean funcionales en presencia de la V_H mutada. Sin embargo, como contingencia, también se preparó por ingeniería una cadena ligera (Ilr-KSHI) que contenía solo unas pocas mutaciones que tendrán el mayor impacto en la depleción de los epítomos de células T y se encontró que la actividad biológica era similar a VB6-845 WT.

25 Tabla 8: segunda versión de V_L algo, mutaciones y actividad biológica

clon	CDR1	FR2	CDR2	FR4	ELISA (µg/ml)	MF
WT	R24	K39-K42	Q50-M51-N53-A55	L106	0,69	100
CDR2	R24	K39-K42	Q50- E51-H53-Q55	L106	0,78	70
FR2	R24	H39-S42	Q50-M51-N53-A55	L106	0,6	68
Ilr-CDR2	K24	K39-K42	Q50- E51-H53-Q55	I106	0,73	57
Ilr-FR2-CDR2	K24	H39-S42	Q50- E51-H53-Q55	I106	0,29	45
Ilr-KSHI	K24	K39- S42	Q50-M51- H53 -A55	I106	0,63	89

Los aminoácidos en negrita corresponden a los residuos mutados. La fluorescencia mediana reportada, MF, es un promedio de dos experimentos independientes y se expresa como % de WT. Numerados según la nomenclatura de Kabat.

- 30 V_H-V_L-algo, segunda versión: La cadena V_H final, Ilr-N35-Q98 se combinó con V_L-Ilr-CDR2, V_L-Ilr-FR2-CDR2 y V_L-Ilr-

KSHI. Como se ve en la tabla 7, solo la construcción VB6-845 que contenía el combinado V_H -IIr-N35-Q98 y V_L -IIr-KSHI tuvo un nivel de expresión y actividad biológica similares al WT y se conoce como VB6-845-Algo. Las otras combinaciones rinden una pérdida significativa de expresión y unión a EpCAM.

Tabla 9: ensayo de la segunda versión de V_H - V_L Algo

V_H	V_L	ELISA (μ g/ml)	MF
WT	WT	1,2	100
IIr-N35-Q98	Ir-CDR2	0,76	45
IIr-N35-Q98	IIr-FR2-CDR2	0,34	38
IIr-N35-Q98	IIr-KSHI	0,9	94

La mediana de fluorescencia reportada, MF, es un promedio de dos experimentos independientes y se expresa como % de WT. Numerados según la nomenclatura de Kabat.

Actividad biológica de VB5-845-Algo

Para evitar la interferencia de deBouganina con el ensayo de proliferación de células T, se creó, expresó y purificó la versión Fab VB5-845 de VB6-845-Algo. La proteína Fab VB5-845-Algo purificada se sometió a varios ensayos biológicos y los datos se compararon con VB5-845-WT.

Ensayo de competición

Para asegurar que no se alteraba la especificidad, se ensayó la capacidad de VB5-845-Algo para competir con la unión de VB6-845 a las células CAL-27 positivas para EpCAM. Como se muestra en la FIG. 13, VB5-845-Algo (círculo abierto) compitió con la unión VB6-845. Se usaron VB4-845 y VB5-845-WT como controles positivos.

Estabilidad en suero humano

Para demostrar que las mutaciones no creaban sitios proteolíticos, se incubaron VB5-845-Algo y VB5-845-WT en suero humano a 37 °C hasta un máximo de 24 horas. La estabilidad de las proteínas VB5 se evaluó mediante análisis por transferencia Western. Como se muestra en la FIG. 14, el análisis no reveló cambios en la intensidad, lo que sugiere que ambas proteínas VB5-845 permanecieron intactas en el suero humano.

Termoestabilidad

Para asegurar que las mutaciones no afectaban la termoestabilidad de la interfaz V_H - V_L , se evaluó la actividad biológica de VB5-845-Algo mediante citometría de flujo después de incubar a 37 °C en 1xPBS durante 0, 3, 6 y 24 horas. Los datos se expresan como el porcentaje de la fluorescencia mediana obtenida a las 0 horas (FIG. 15). VB5-845-Algo mostró un ligero aumento sobre el control de 0 horas, lo que sugiere que el resto Fab es térmicamente estable.

Afinidad de unión

La afinidad de unión se midió por citometría de flujo usando células tumorales CAL-27. Usando una curva de titulación, se determinó la K_D como se describe en los diseños experimentales (Tabla 10).

Tabla 10

clon	K_D (nM)
VB5-845-WT	1,56
VB5-845-Algo	1,31

Actividad biológica de VB6-845-Algo

Para evaluar la actividad biológica, VB6-845-Algo (que contiene deBouganina) se purificó y se ensayó mediante citometría de flujo y ensayo MTS usando las líneas celulares positivas para EpCAM CAL-27, HT-29, MCF-7 y OVCAR-3. También se incluyeron las líneas celulares negativas para EpCAM A-375 y COLO-320 para asegurar que no se alteraba la especificidad de VB6-845-Algo. Como se muestra en la Tabla 11, la unión de VB6-845-Algo a las líneas celulares positivas para EpCAM fue un 53% a 32% menor que la de VB6-845-WT (usado como un control positivo). Como consecuencia, VB6-845-Algo fue de 7 a 9 veces menos potente en comparación con WT. Como era de esperar, no se midieron ni unión ni CI_{50} con las líneas celulares negativas para EpCAM.

Tabla 11

	VB6-845-Algo		VB6-845-WT	
	FI (100 ng/mL)	CI ₅₀ (nM)	FI (100 ng/mL)	CI ₅₀ (nM)
CAL-27	14	18	29,3	2,1
HT-29	41,6	15	58,1	1,7
MCF-7	27,7	2,3	46	0,3
OVCAR-3	40,9	2,9	59,3	0,4
A-375	1	> 50	1,05	> 50
COLO-320	1,3	> 50	1,6	> 50

Números representativos de dos experimentos independientes. Las veces de incremento (FI) es un promedio de dos mediciones independientes.

5 Inmunogenicidad

El perfil de inmunogenicidad del VB5-845-Algo se midió por la proliferación de células T CD3+CD4+ y se comparó con VB5-845-WT. Como se esperaba, 12 de los 53 donantes respondieron a VB5-845-WT, lo que representa casi el 23% (FIG. 16). En contraste, solo 2 donantes dieron una respuesta al VB5-845-Algo (casi el 4%), lo que demuestra que las mutaciones introducidas han reducido significativamente el potencial inmunogénico del resto Fab.

10 Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 (V_H-C_H o DI V_H-C_H desinmunizado)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMG
WINTYTGESTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAI
KGDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO : 2 (V_L-C_L o DI V_L-C_L desinmunizado)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSTKSLLHSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGTGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

15 **SEQ ID NO: 3** (toxina ETA 252-608)

EGGSLAALTAHQACHLPLETFTTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAAR
LSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERFVRQG
TGNDDEAGAASADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGG
DVSFSTRGTQNWTERLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRAR
SQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPG
FYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERT
VVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPP

SEQ ID NO: 4 (proteína bouganina modificada)

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDIT
TTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVTN
RVTLTDFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKLFSIEAIHGKTINGQEAAKFFL
IVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENNWGDIDSDAIHKSSP
QCTTINPALQLISPSNDPWVNVKVSQISPDMGILKFKSSK

SEQ ID NO: 5 (V_H - C_H o WT V_H - C_H de tipo salvaje)

EVQLVQSGPGLVQPGGSRISCAASGYTFTNYGMNVVKQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKG
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSC

5 **SEQ ID NO: 6** (V_L - C_L o WT V_L - C_L de tipo salvaje)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSTKSLLHSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGT
KVELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

SEQ ID NO: 7 (secuencia de ADN de VB5-845 desinmunizado)

CTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTCTATTTCAAGGAG
ACAGTCATAatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgctgccccaccagcgatggcgG
AAGTACAGCTGGTCgaaTCCGGTggtGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTAGCctgC
GTctgAGCTGCGCGGCGAGCGGTTACACCTTACCgcgTACGGTATGAACTG
GGTtctgCAGGCTCCGGGTAAAGGTTTGAATGGATGGGTTGGATCAACAC
CTATACCGGTGAGTCTACCTACGCTGATAGCggtAAAGGCCGTTTACCAtcA
GCgctGACACTAGCaaaaacaccGCGTACCTGCAGatgAACTCTCTGCGTGCTGAG
GACACTGCGGTTTACTACTGCGCTCGTTTCGCGATCAAAGGTGACTATTGG
GGTCAGGGTACTCTGggtACCGTTAGCAGCGCTAGCACTAAgGGcCCGTCCG
TTTTCCCACTGGCTCCGTCTTCTAAAAGCACTTCTGGTGGTACCGCGGCTC
TGGGTTGCCTTGTTAAAGACTACTTCCCTGAACCGGTCACCGTTAGCTGGA
ACTCCGGTGCGTTGACCTCTGGTGTTCACACCTTCCCAGCGGTTCTGCAGT
CTAGCGGTCTGTATAGCCTGAGCTCTGTAGTTACCGTTCCGTCTTCTAGCC
TGGGTACGCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAACCGAGCAACACT
AAAGTGGATAAAAAAGTTGAACCGAAGTCTTGCTAGTAATCTAGAGTGA
CCTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTCTATTTCAAGGA
GACAGTCATAATGAAATACCTTCTGCCGACCGCTGCCGCTGGTCTGCTGCT
GTTGGCTGCTCAACCGGTATGGCAGACATCCAGATGACCCAGTCCCCGT
CTAGCCTGAGCGCAAGCGTTGGTGACCGTGTGACCATCACCTGCCGTAGC

ACTAAATCCCTGCTGCACTCTAACGGCATCACCTACCTGTATTGGTACCAA
CAGAAACCGGGTAAAGCTCCGAAACTGCTGATCTACCAGATGTCTAACCT
GGCTAGCGGCGTTTCCTTCTCGTTTTTCTTCTAGCGGTAGCGGTACTGACTT
CACCCCTGACCATTAGCTCTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCGACCTACTATTG
CGCTCAGAACCTTGAAATCCCGCGTACCTTCGGC^{acc}GGTACCAAAGTTGA
AatcAAGCGTACCGTTGCGGCTCCGTCTGTTTTTCATCTTCCCACCTAGCGAT
GAACAGCTTAAATCTGGTACTGCTAGCGTAGTTTGCCTGCTTAACAACCTC
TACCCTCGTGAAGCTAAAGTTCAGTGGAAGTTGACAACGCTCTGCAGTC
TGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGATAGCAAAGATAGCACCT
ATAGCCTGTCTAGCACCTGACCCTTAGCAAGGCGGACTATGAAAAACAC
AAAGTTTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAAGGTCTGTCTTCTCCGGTGACT
AAATCCTTTAACCGTGGCGAATGCTAGTGA

SEQ ID NO: 8 (4D5MOC-B)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSTKSLHNSGITYLYWYQQKPGKAPK
LLIYQMSNLSAGVPSRFSSSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCAQNLEIP
RTFGQGKVELKRTPSHNSHQVPSAGGPTANSGTSGSEVQLVQSGPGLVQ
PGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGWINTYTGESTYADSF
KGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 9 (proteína bouganina modificada)

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDIT
TTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVTN
RVTLTFDGSYQKLVNAAX¹DRKX²LX³LGVS⁴KLEFSIEAIHGKTINGQEX⁵AK
FFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENNWGDIDAIHK

- 5 SSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPDMGILKFKSSK
en donde X¹ en la posición 123 es Thr o Ala o Gln; X² en la posición 127 es Gly o Ala; X³ en la posición 129 es Gln o Gly o Glu; X⁴ en la posición 133 es Asn o Asp o Thr o Ala o Arg o Gln o Glu o Gly o His o Lys o Ser; y X⁵ en la posición 152 es Gln o Ala.

SEQ ID NO: 10 (VB6-845)

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLVQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFT
 NYGMNWVKQAPGKGLEWMGWINTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASAAY
 LQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQLYNTVSF
 NLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDDRFLVDITTTSKKT
 VKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTF
 DGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKLFEISIAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMV
 SEARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENNWGDSDAIHKSSPQCTTINP
 ALQLISPSNDPWVNVKVSQISPDGMILKFKSSKMKYLLPTAAAGLLLLAAQPA
 MAHHHHHHDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSTKSLLHSNGITYLYWYQQK
 PGKAPKLLIYQMSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLE
 IPRTFGQGTKVELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 11 (Algo V_H-C_H)

EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQIQLREEDTAVYYCARFAIQG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSC

5 **SEQ ID NO: 12** (Algo V_L-C_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKSTKSLLHSNGITYLYWYQQKPGSAPKLLIY
 QMSHLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC

SEQ ID NO: 13 (DI V_H-C_H-deBouganina)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMG
 WINTYTGESTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAI
 KGDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAK
 GTPVCQLPVTLQTIADDDRFLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWD
 GKDRVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALEL
 GVNKLFEISIAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLYGS
 FKPNFKVLNLENNWGDSDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVNVKVSQIS
 PDMGILKFKSSK

10

SEQ ID NO: 14 (Algo V_H-C_H-deBouganina)

EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQIQSLREEDTAVYYCARFAIQG
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
VCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
DRAVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISPD
MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 15 (WT V_H-C_H-deBouganina)

EVQLVQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKG
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
VCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
DRAVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISPD
MGILKFKSSK

5 **SEQ ID NO: 16** (DI V_L-C_L-deBouganina)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSTKSLLSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGTGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGECTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVC
QLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDR
AVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNK
LEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNF
KVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISPD
LKFSSK

SEQ ID NO: 17 (Algo V_L-C_L-deBouganina)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSTKSLLHSNGITYLYWYQQKPGSAPKLLIY
QMSHLASGVPSRFSSSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGECTRHQRPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLP
VTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVF
LDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKFES
IEAIHGKTINGQEAARKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVL
NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVNVKVSQISPDGMILKF
KSSK

SEQ ID NO: 18 (WT V_L-C_L-deBouganina)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSTKSLLHSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGT
KVELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGECTRHQRPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVC
QLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDR
AVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNK
LEFSIEAIHGKTINGQEAARKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNF
KVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVNVKVSQISPDGMGI
LKFKSSK

SEQ ID NO: 19 (Secuencia nucleótida de DI V_L-C_L)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT
GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCG GAA GTA CAG
CTG GTC gaa TCC GGT ggt GGT CTG GTT CAG CCG GGT GGT AGC ctg CGT
ctg AGC TGC GCG GCG AGC GGT TAC ACC TTC ACC gcg TAC GGT ATG
AAC TGG GTT cgt CAG GCT CCG GGT AAA GGT TTG GAA TGG ATG GGT
TGG ATC AAC ACC TAT ACC GGT GAG TCT ACC TAC GCT GAT AGC gtt
AAA GGC CGT TTC ACC atc AGC gct GAC ACT TCT aaa aac acc GCG TAC
CTG CAG atg AAC TCT CTG CGT GCT GAG GAC ACT GCG GTT TAC TAC
TGC GCT CGT TTC GCG ATC AAA GGT GAC TAT TGG GGT CAG GGT ACT
CTG gtt ACC GTT AGC AGC GCT AGC ACT AAG GGC CCG TCC GTT TTC
CCA CTG GCT CCG TCT TCT AAA AGC ACT TCT GGT GGT ACC GCG GCT
CTG GGT TGC CTT GTT AAA GAC TAC TTC CCT GAA CCG GTC ACC GTT
AGC TGG AAC TCC GGT GCG TTG ACC TCT GGT GTT CAC ACC TTC CCA
GCG GTT CTG CAG TCT AGC GGT CTG TAT AGC CTG AGC TCT GTA GTT
ACC GTT CCG TCT TCT AGC CTG GGT ACG CAG ACC TAC ATC TGC AAC
GTG AAC CAC AAA CCG AGC AAC ACT AAA GTG GAT AAA AAA GTT
GAA CCG AAG TCT TGC TAG TAA

SEQ ID NO: 20 (Secuencia nucleótida de DI V_L-C_L)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
 AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTT CTG CCG ACC GCT GCC GCT
 GGT CTG CTG CTG TTG GCT GCT CAA CCG GCT ATG GCA GAC ATC CAG
 ATG ACC CAG TCC CCG TCT AGC CTG AGC GCA AGC GTT GGT GAC CGT
 GTG ACC ATC ACC TGC CGT AGC ACT AAA TCC CTG CTG CAC TCT AAC
 GGC ATC ACC TAC CTG TAT TGG TAC CAA CAG AAA CCG GGT AAA GCT
 CCG AAA CTG CTG ATC TAC CAG ATG TCT AAC CTG GCT AGC GGC GTT
 CCT TCT CGT TTT TCT TCT AGC GGT AGC GGT ACT GAC TTC ACC CTG
 ACC ATT AGC TCT CTG CAG CCT GAA GAC TTT GCG ACC TAC TAT TGC
 GCT CAG AAC CTT GAA ATC CCG CGT ACC TTC GGC acc GGT ACC AAA
 GTT GAA atc AAG CGT ACC GTT GCG GCT CCG TCT GTT TTC ATC TTC
 CCA CCT AGC GAT GAA CAG CTT AAA TCT GGT ACT GCT AGC GTA GTT
 TGC CTG CTT AAC AAC TTC TAC CCT CGT GAA GCT AAA GTT CAG TGG
 AAA GTT GAC AAC GCT CTG CAG TCT GGT AAC TCT CAG GAA TCT GTG
 ACC GAA CAG GAT AGC AAA GAT AGC ACC TAT AGC CTG TCT AGC ACC
 CTG ACC CTT AGC AAG GCG GAC TAT GAA AAA CAC AAA GTT TAC GCT
 TGC GAG GTG ACC CAC CAA GGT CTG TCT TCT CCG GTG ACT AAA TCC
 TTT AAC CGT GGC GAA TGC TAG TGA

5 **SEQ ID NO: 21** (Secuencia nucleótida de WT V_H-C_H)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
 AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT
 GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCG GAA GTA CAG
 CTG GTT CAG TCC GGC CCG GGT CTT GTT CAA CCG GGT GGT TCC GTT
 CGT ATC TCT TGC GCT GCT TCT GGT TAC ACG TTC ACC AAC TAC GGC
 ATG AAC TGG GTC AAA CAG GCT CCG GGT AAA GGC CTG GAA TGG
 ATG GGC TGG ATC AAC ACC TAC ACC GGT GAA TCC ACC TAC GCT GAC
 TCC TTC AAA GGT CGC TTC ACT TTC TCC CTC GAC ACA AGT GCT AGT
 GCT GCA TAC CTC CAA ATC AAC TCG CTG CGT GCA GAG GAT ACA GCA
 GTC TAT TAC TGC GCC CGT TTC GCT ATC AAA GGT GAC TAC TGG GGT
 CAA GGC ACG CTG CTG ACC GTT TCC TCG GCT AGC ACC AAA GGC CCA
 TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC
 ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG
 GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
 ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC
 AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC
 ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC
 AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT TAG TGA

SEQ ID NO: 22 (Secuencia nucleótida de WT V_L-C_L)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
 AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT

GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCG CAC CAT CAT
CAC CAT CAC GAT ATC CAG ATG ACC CAG TCC CCG TCC TCC CTG AGT
GCT TCT GTT GGT GAC CGT GTT ACC ATC ACC TGC CGT TCC ACC AAA
TCC CTC CTG CAC TCC AAC GGT ATC ACC TAC CTT TAT TGG TAT CAA
CAG AAA CCG GGT AAA GCT CCG AAA CTT CTG ATC TAC CAG ATG TCC
AAC CTG GCT TCC GGT GTT CCG TCT CGT TTC TCC AGT TCT GGT TCT
GGT ACC GAC TTC ACC CTG ACC ATC TCT TCT CTG CAG CCG GAA GAC
TTC GCT ACC TAC TAC TGC GCT CAG AAC CTG GAA ATC CCG CGT ACC
TTC GGT CAG GGT ACC AAA GTT GAA CTT AAG CGC ACT GTG GCT GCA
CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT
GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG
GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC
AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA
GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT
TAG TGA

SEQ ID NO: 23 (Secuencia nucleótida de Algo V_H-C_H)

GAATTCCTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTCTATTTCA
AGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTG
TTATTACTCGCTGCCCAACCAGCGATGGCGGAAGTACAGCTGcagCAGTCC
GGTCCGGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTAGCGTTCTGTATTAGCTGCGCGGC
GAGCGGTTACACCTTACCCgagTACGGTATGAACTGGGTtctCAGGCTCCG
GGTAAAGGTTTGAATGGATGGGTGGATCAACACCTATAACCGGTGAGTC
TACCTACGCTGATAGCTTCAAAGGCCGTTTCgaaTTTAGCCTTGACACTcaca
cAGCtctGCGTACCTGCAGATTcagTCTCTGCGTgaaGAGGACACTGCGGTTTA
CTACTGCGCTCGTTTCGCGATCagGGTGAATATTGGGGTCAGGGTACTCTG
gttACCGTTAGCAGCGCTAGCACTAAgGGcCCGTCCGTTTTCCCACTGGCTCC
GTCTTCTAAAAGCACTTCTGGTGGTACCGCGGCTCTGGGTGTCCTTGTTAA
AGACTACTTCCCTGAACCGGTCACCGTTAGCTGGAACCTCCGGTGCGTTGAC
CTCTGGTGTTACACCTTCCCAGCGGTTCTGCAGTCTAGCGGTCTGTATAG
CCTGAGCTCTGTAGTTACCGTTCCGTCTTCTAGCCTGGGTACGCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAACACAAACCGAGCAACACTAAAGTGGATAAAAAA
5 GTTGAACCGAAGTCTTGCTAGTAA

SEQ ID NO: 24 (Secuencia nucleótida de Algo V_L-C_L)

TCTAGAGTCGACCTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTC
TATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTTCTGCCGACCGCTGCCGCT
GGTCTGCTGCTGTTGGCTGCTCAACCGGCTATGGCAGACATCCAGATGAC
CCAGTCCCCGTCTAGCCTGAGCGCAAGCGTTGGTGACCGTGTGACCATCA
CCTGC^{aaa}AGCACTAAATCCCTGCTGCACTCTAACGGCATCACCTACCTGTA
TTGGTACCAACAGAAACCGGGT^{tct}GCTCCGAAACTGCTGATCTACCAGATG
TCT^{cac}CTGGCTAGCGGCGTTCCTTCTCGTTTTTCTTCTAGCGGTAGCGGTAC
TGACTTCACCTGACCATTAGCTCTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCGACCTA
CTATTGCGCTCAGAACCTTGAAATCCCGCGTACCTTCGGCCAGGGTACCA
AAGTTGAA^{atc}AAGCGTACCGTTGCGGCTCCGTCTGTTTTTCATCTTCCCACC
TAGCGATGAACAGCTTAAATCTGGTACTGCTAGCGTAGTTTGCCTGCTTAA
CAACTTCTACCCTCGTGAAGCTAAAGTTCAGTGGAAAGTTGACAACGCTC
TGCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGATAGCAAAGAT
AGCACCTATAGCCTGTCTAGCACCTGACCCTTAGCAAGGCGGACTATGA
AAAACACAAAGTTTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAAGGTCTGTCTTCTC
CGGTGACTAAATCCTTTAACCGTGGCGAATGC

SEQ ID NO: 25 (Secuencia nucleótida de DI V_H-C_H-deBouganina)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT
GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCG GAA GTA CAG
CTG GTC ^{gaa} TCC GGT ^{ggt} GGT CTG GTT CAG CCG GGT GGT AGC ^{ctg} CGT
^{ctg} AGC TGC GCG GCG AGC GGT TAC ACC TTC ACC ^{gcg} TAC GGT ATG
AAC TGG GTT ^{cgt} CAG GCT CCG GGT AAA GGT TTG GAA TGG ATG GGT
TGG ATC AAC ACC TAT ACC GGT GAG TCT ACC TAC GCT GAT AGC ^{gtt}
AAA GGC CGT TTC ACC ^{atc} AGC ^{gct} GAC ACT TCT ^{aaa} ^{aac} ^{acc} GCG TAC
CTG CAG ^{atg} AAC TCT CTG CGT GCT GAG GAC ACT GCG GTT TAC TAC
TGC GCT CGT TTC GCG ATC AAA GGT GAC TAT TGG GGT CAG GGT ACT
CTG ^{gtt} ACC GTT AGC AGC GCT AGC ACT AAG GGC CCG TCC GTT TTC

CCA CTG GCT CCG TCT TCT AAA AGC ACT TCT GGT GGT ACC GCG GCT
 CTG GGT TGC CTT GTT AAA GAC TAC TTC CCT GAA CCG GTC ACC GTT
 AGC TGG AAC TCC GGT GCG TTG ACC TCT GGT GTT CAC ACC TTC CCA
 GCG GTT CTG CAG TCT AGC GGT CTG TAT AGC CTG AGC TCT GTA GTT
 ACC GTT CCG TCT TCT AGC CTG GGT ACG CAG ACC TAC ATC TGC AAC
 GTG AAC CAC AAA CCG AGC AAC ACT AAA GTG GAT AAA AAA GTT
 GAA CCG AAG TCT TGC ACC CGT CAC CGT CAG CCG CGT GGT TGG GAA
 CAG aaa TATAACACCGTATCTTTTAACCTGG GTG
 AGGCGTATGAATACCCGACCTTCATCCAGGACCTGCGTAATGAACTTG
 CTAAAGGTACCCCTGTTTGCCAGCTGCCTGTGACCCTGCAGACCATCGCTG
 ATGATAAACGTTTCGTTCTGGTTGACATTACCACCACCTCCAAAAAACC
 TTAAAGTCGCGATCGATGTGACCGACGTTTACGTGGTAGGTTACCAGGAT
 AAATGGGACGGTAAAGATCGTGCGGTTTTCTGGACAAAGTCCGACCGT
 AGCGACTTCTAAACTGTTCCCAGGTGTGACCAACCGTGTGACCCTGACCTT
 CGACGGCAGCTATCAGAACTGGTTAACGCGGCCAAAGCTGATCGTAAAG
 CTCTCGAACTGGGTGTTAACAACTGGAGTTCAGCATTGAAGCTATCCAC
 GGTAACCATCAACGGTCAAGAAGCAGCTAAATTCTTCTGATCGTGAT
 CCAGATGGTTAGCGAAGCAGCGCGTTTTAAATACATTGAAACCGAAGTAG
 TTGATCGTGGTCTGTATGGTAGCTTCAAACCGAACTTCAAAGTTCTTAACC
 TGGAGAACAACCTGGGGTGACATTAGCGACGCGATCCATAAATCTTCCCCG
 CAATGCACCACCATTAACCCGGCTCTGCAGCTGATCTCTCCGTCTAACGAT
 CCGTGGGTAGTTAACAAAGTGTCTCAAATCAGCCCGGACATGGGTATCCT
 GAAATTTAAATCTAGCAAATAGTGACTCGAG

SEQ ID NO: 26 (Secuencia nucleótida de Algo V_H-C_H-deBouganina)
 GAATTCCTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTCTATTTCA
 AGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTG
 TTATTACTCGCTGCCCAACCAGCGATGGCGGAAGTACAGCTGcagCAGTCC
 GGTCCGGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTAGCGTTCGTATTAGCTGCGCGGC
 GAGCGGTTACACCTTACCgcgTACGGTATGAACTGGGTTcgtCAGGCTCCG
 GGTAAGGTTTGGAAATGGATGGGTTGGATCAACACCTATAACGGTGAGTC
 TACCTACGCTGATAGCTTCAAAGGCCGTTTCgaaTTTAGCCTTGACACTcaca
 cAGCtctGCGTACCTGCAGATTcagTCTCTGCGTgaaGAGGACACTGCGGTTTA

CTACTGCGCTCGTTTCGCGATC_{cag}GGTGACTATTGGGGTCAGGGTACTCTG
 gttACCGTTAGCAGCGCTAGCACTAA_gGG_cCCGTCCGTTTTCCCACTGGCTCC
 GTCTTCTAAAAGCACTTCTGGTGGTACCGCGGCTCTGGGTGCCTTGTTAA
 AGACTACTTCCCTGAACCGGTCACCGTTAGCTGGA_{ACT}CCGGTGCGTTGAC
 CTCTGGTGTTACACCTTCCCAGCGGTTCTGCAGTCTAGCGGTCTGTATAG
 CCTGAGCTCTGTAGTTACCGTTCCGTCTTCTAGCCTGGGTACGCAGACCTA
 CATCTGCAACGTGAACCACAAACCGAGCAACACTAAAGTGGATAAAAAA
 GTTGAACCGAAGTCTTGCACCCGTCACCGTCAGCCGCGTGGTTGGGAACA
 GaaaTATAACACCGTATCTTTTAACCTGGGTGAGGCGTATGAATACCCGACC
 TTCATCCAGGACCTGCGTAATGA_{ACT}TGCTAAAGGTACCCCTGTTTGCCAG
 CTGCCTGTGACCTGCAGACCATCGCTGATGATAAACGTTTCGTTCTGGTT
 GACATTACCACCACCTCCAAAAAACCGTTAAAGTCGCGATCGATGTGAC
 CGACGTTTACGTGGTAGGTTACCAGGATAAATGGGACGGTAAAGATCGTG
 CGGTTTTCTGGACAAAGTTCCGACCGTAGCGACTTCTAAACTGTTCCCAG
 GTGTGACCAACCGTGTGACCTTGACCTTCGACGGCAGCTATCAGAACTG
 GTTAACGCGGCCAAAGCTGATCGTAAAGCTCTCGAACTGGGTGTAAACAA
 ACTGGAGTTCAGCATTGAAGCTATCCACGGTAAAACCATCAACGGTCAAG
 AAGCAGCTAAATTCTTCTGATCGTGATCCAGATGGTTAGCGAAGCAGCG
 CGTTTTAAATACATTGAAACCGAAGTAGTTGATCGTGGTCTGTATGGTAGC
 TTCAAACCGAACTTCAAAGTTCTTAACCTGGAGAACA_{ACT}GGGGTGACAT
 TAGCGACGCGATCCATAAATCTTCCCCGCAATGCACCACCATTAACCCGG
 CTCTGCAGCTGATCTCTCCGTCTAACGATCCGTGGGTAGTTAACAAAGTGT
 CTCAAATCAGCCCGGACATGGGTATCCTGAAATTTAAATCTAGCAAATAG
 TGA_{CT}CGAG

SEQ ID NO: 27 (Secuencia nucleótida de WT V_H-C_H-deBouganina)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
 AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT
 GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCG GAA GTA CAG
 CTG GTT CAG TCC GGC CCG GGT CTT GTT CAA CCG GGT GGT TCC GTT
 CGT ATC TCT TGC GCT GCT TCT GGT TAC ACG TTC ACC AAC TAC GGC
 ATG AAC TGG GTC AAA CAG GCT CCG GGT AAA GGC CTG GAA TGG
 ATG GGC TGG ATC AAC ACC TAC ACC GGT GAA TCC ACC TAC GCT GAC

TCC TTC AAA GGT CGC TTC ACT TTC TCC CTC GAC ACA AGT GCT AGT
GCT GCA TAC CTC CAA ATC AAC TCG CTG CGT GCA GAG GAT ACA GCA
GTC TAT TAC TGC GCC CGT TTC GCT ATC AAA GGT GAC TAC TGG GGT
CAA GGC ACG CTG CTG ACC GTT TCC TCG GCT AGC ACC AAA GGC CCA
TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC
ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG
GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC
AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC
ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC
AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT
TGTACCCGTCACCGTCAGCCGCGTGGTTGG GAA CAG CTC
TATAACACCGTATCTTTTAACTGGGTGAGGCGTATGA ATACCCG
ACCTTCATCCAGGACCTGCGTAATGAACTTGCTAAAGGTACCCCTGTTTGC
CAGCTGCCTGTGACCCTGCAGACCATCGCTGATGATAAACGTTTCGTTCTG
GTTGACATTACCACCACCTCCAAAAAACC GTTAAAGTCGCGATCGATGT
GACCGACGTTTACGTGGTAGGTTACCAGGATAAATGGGACGGTAAAGATC
GTGCGGTTTTTCCTGGACAAAGTTCGACCGTAGCGACTTCTAAACTGTTCC
CAGGTGTGACCAACCGTGTGACCCTGACCTTCGACGGCAGCTATCAGAAA
CTGGTTAACGCGGCCAAAGCTGATCGTAAAGCTCTCGAACTGGGTGTTAA
CAAAGTGGAGTTCAGCATTGAAGCTATCCACGGTAAAACCATCAACGGTC
AAGAAGCAGCTAAATTCTTCCTGATCGTGATCCAGATGGTTAGCGAAGCA
GCGCGTTTTTAAATACATTGAAACCGAAGTAGTTGATCGTGGTCTGTATGGT
AGCTTCAAACCGAACTTCAAAGTTCTTAACCTGGAGAACAACCTGGGGTGA
CATTAGCGACGCGATCCATAAATCTTCCCGCAATGCACCACCATTAAACC
CGGCTCTGCAGCTGATCTCTCCGTCTAACGATCCGTGGGTAGTTAAACAAAG
TGTCTCAAATCAGCCCGGACATGGGTATCCTGAAATTTAAATCTAGCAAA
TAGTGA CTGAG

SEQ ID NO: 28 (Secuencia nucleótida de DI VL-C_L-deBouganina)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTT CTG CCG ACC GCT GCC GCT
GGT CTG CTG CTG TTG GCT GCT CAA CCG GCT ATG GCA GAC ATC CAG

ATG ACC CAG TCC CCG TCT AGC CTG AGC GCA AGC GTT GGT GAC CGT
 GTG ACC ATC ACC TGC CGT AGC ACT AAA TCC CTG CTG CAC TCT AAC
 GGC ATC ACC TAC CTG TAT TGG TAC CAA CAG AAA CCG GGT AAA GCT
 CCG AAA CTG CTG ATC TAC CAG ATG TCT AAC CTG GCT AGC GGC GTT
 CCT TCT CGT TTT TCT TCT AGC GGT AGC GGT ACT GAC TTC ACC CTG
 ACC ATT AGC TCT CTG CAG CCT GAA GAC TTT GCG ACC TAC TAT TGC
 GCT CAG AAC CTT GAA ATC CCG CGT ACC TTC GGC acc GGT ACC AAA
 GTT GAA atc AAG CGT ACC GTT GCG GCT CCG TCT GTT TTC ATC TTC
 CCA CCT AGC GAT GAA CAG CTT AAA TCT GGT ACT GCT AGC GTA GTT
 TGC CTG CTT AAC AAC TTC TAC CCT CGT GAA GCT AAA GTT CAG TGG
 AAA GTT GAC AAC GCT CTG CAG TCT GGT AAC TCT CAG GAA TCT GTG
 ACC GAA CAG GAT AGC AAA GAT AGC ACC TAT AGC CTG TCT AGC ACC
 CTG ACC CTT AGC AAG GCG GAC TAT GAA AAA CAC AAA GTT TAC GCT
 TGC GAG GTG ACC CAC CAA GGT CTG TCT TCT CCG GTG ACT AAA TCC
 TTT AAC CGT GGC GAA TGCACCCGTCACCGTCAGCCGCGTGGTTGGGA
 ACAGaaa TATAA
 CACCGTATCTTTTAACCTGGGTGAGGCGTATGAATACCCGACCT TCATC
 CAGGACCTGCGTAATGAACTTGCTAAAGGTACCCCTGTTTGCCAGCTGCCT
 GTGACCCTGCAGACCATCGCTGATGATAAACGTTTCGTTCTGGTTGACATT
 ACCACCACCTCCAAAAAAACCGTTAAAGTCGCGATCGATGTGACCGACGT
 TTACGTGGTAGGTTACCAGGATAAATGGGACGGTAAAGATCGTGCGGTTT
 TCCTGGACAAAGTTCCGACCGTAGCGACTTCTAAACTGTTCCCAGGTGTGA
 CCAACCGTGTGACCCTGACCTTCGACGGCAGCTATCAGAAACTGGTTAAC
 GCGGCCAAAGCTGATCGTAAAGCTCTCGAACTGGGTGTTAACAAACTGGA
 GTTCAGCATTGAAGCTATCCACGGTAAAACCATCAACGGTCAAGAAGCAG
 CTAAATTCTTCCTGATCGTGATCCAGATGGTTAGCGAAGCAGCGCGTTTTA
 AATACATTGAAACCGAAGTAGTTGATCGTGGTCTGTATGGTAGCTTCAAA
 CCGAACTTCAAAGTTCTTAACCTGGAGAACAACCTGGGGTGACATTAGCGA
 CGCGATCCATAAATCTTCCCCGCAATGCACCACCATTAACCCGGCTCTGCA
 GCTGATCTCTCCGTCTAACGATCCGTGGGTAGTTAACAAAGTGTCTCAAAT
 CAGCCCGGACATGGGTATCCTGAAATTTAAATCTAGCAAATAGTGA CTG
 AG

SEQ ID NO: 29 (Secuencia nucleótida de Algo V_L-C_L-deBouganina)

TCTAGAGTCGACCTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTC
TATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTTCTGCCGACCGCTGCCGCT
GGTCTGCTGCTGTTGGCTGCTCAACCGGCTATGGCAGACATCCAGATGAC
CCAGTCCCCGTCTAGCCTGAGCGCAAGCGTTGGTGACCGTGTGACCATCA
CCTGC^{aaa}AGCACTAAATCCCTGCTGCACTCTAACGGCATCACCTACCTGTA
TTGGTACCAACAGAAACCGGGT^{tct}GCTCCGAAACTGCTGATCTACCAGATG
TCT^{cac}CTGGCTAGCGGCGTTCCTTCTCGTTTTTCTTCTAGCGGTAGCGGTAC
TGACTTCACCTGACCATTAGCTCTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCGACCTA
CTATTGCGCTCAGAACCTTGAAATCCCGCGTACCTTCGGCCAGGGTACCA
AAGTTGAA^{atc}AAGCGTACCGTTGCGGGTCCGTCTGTTTTTCATCTTCCCACC
TAGCGATGAACAGCTTAAATCTGGTACTGCTAGCGTAGTTTGCCTGCTTAA
CAACTTCTACCCTCGTGAAGCTAAAGTTCAGTGGAAAGTTGACAACGCTC
TGCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGATAGCAAAGAT
AGCACCTATAGCCTGTCTAGCACCTGACCTTAGCAAGGCGGACTATGA
AAAACACAAAGTTTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAAGGTCTGTCTTCTC
CGGTGACTAAATCCTTTAACCGTGGCGAATGCACCCGTCACCGTCAGCCG
CGTGGTTGGGAACAG^{aaa}TATAACACCGTATCTTTTAACCTGGGTG
AGGCGTATGAATACCCGACCTTCATCCAGGACCTGCGTAAT
GAACTTGCTAAAGGTACCCCTGTTTGCCAGCTGCCTGTGACCCTGCAGACC
ATCGCTGATGATAAACGTTTCGTTCTGGTTGACATTACCACCACCTCCAAA
AAAACCGTTAAAGTCGCGATCGATGTGACCGACGTTTACGTGGTAGGTTA
CCAGGATAAATGGGACGGTAAAGATCGTGCGGTTTTCTGGACAAAGTTC
CGACCGTAGCGACTTCTAAACTGTTCCAGGTGTGACCAACCGTGTGACC
CTGACCTTCGACGGCAGCTATCAGAAACTGGTTAACGCGGCCAAAGCTGA
TCGTAAAGCTCTCGAACTGGGTGTTAACAACCTGGAGTTCAGCATTGAAG
CTATCCACGGTAAAACCATCAACGGTCAAGAAGCAGCTAAATTCTTCCTG
ATCGTGATCCAGATGGTTAGCGAAGCAGCGCGTTTTAAATACATTGAAAC
CGAAGTAGTTGATCGTGGTCTGTATGGTAGCTTCAAACCGAACTTCAAAG
TTCTTAACCTGGAGAACAACCTGGGGTGACATTAGCGACGCGATCCATAAA
TCTTCCCCGCAATGCACCACCATTAACCCGGCTCTGCAGCTGATCTCTCCG
TCTAACGATCCGTGGGTAGTTAACAAGTGTCTCAAATCAGCCCGGACAT
GGGTATCCTGAAATTTAAATCTAGCAAATAGTGACTCGAG

SEQ ID NO: 30 (Secuencia nucleótida de WT V_L-C_L-deBouganina)

CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT GCC CAT GAA AAT TCT ATT TCA
 AGG AGA CAG TCA TA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT
 GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCG CAC CAT CAT
 CAC CAT CAC GAT ATC CAG ATG ACC CAG TCC CCG TCC TCC CTG AGT
 GCT TCT GTT GGT GAC CGT GTT ACC ATC ACC TGC CGT TCC ACC AAA
 TCC CTC CTG CAC TCC AAC GGT ATC ACC TAC CTT TAT TGG TAT CAA
 CAG AAA CCG GGT AAA GCT CCG AAA CTT CTG ATC TAC CAG ATG TCC
 AAC CTG GCT TCC GGT GTT CCG TCT CGT TTC TCC AGT TCT GGT TCT
 GGT ACC GAC TTC ACC CTG ACC ATC TCT TCT CTG CAG CCG GAA GAC
 TTC GCT ACC TAC TAC TGC GCT CAG AAC CTG GAA ATC CCG CGT ACC
 TTC GGT CAG GGT ACC AAA GTT GAA CTT AAG CGC ACT GTG GCT GCA
 CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT
 GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
 GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG
 GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC
 AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA
 GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
 GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT
 ACCCGTCACCGTCAGCCG
 CGTGGTTGGGAACAGCTCTATAACACCGTATCTTTTAACCT
 GGGTGAGGCGT ATG
 AATACCCGACCTTCATCCAGGACCTGCGTAATGAACTTG CTAAAGGT
 ACCCCTGTTTGCCAGCTGCCTGTGACCCTGCAGACCATCGCTG
 ATGATAAA
 CGTTTCGTTCTGGTTGACATTACCACCACCTCCAAAAAACCGTTAAAGTC
 GCGATCGATGTGACCGACGTTTACGTGGTAGGTTACCAGGATAAATGGGA
 CGGTAAAGATCGTGCGGTTTTCTGGACAAAGTTCCGACCGTAGCGACTT
 CTAAACTGTTCCCAGGTGTGACCAACCGTGTGACCCTGACCTTCGACGGC
 AGCTATCAGAACTGGTTAACGCGGCCAAAGCTGATCGTAAAGCTCTCGA
 ACTGGGTGTTAACAACACTGGAGTTCAGCATTGAAGCTATCCACGGTAAAA
 CCATCAACGGTCAAGAAGCAGCTAAATTCTTCCTGATCGTGATCCAGATG
 GTTAGCGAAGCAGCGCGTTTTAAATACATTGAAACCGAAGTAGTTGATCG
 TGGTCTGTATGGTAGCTTCAAACCGAACTTCAAAGTTCTTAACCTGGAGAA
 CAACTGGGGTGACATTAGCGACGCGATCCATAAATCTTCCCCGCAATGCA
 CCACCATTAACCCGGCTCTGCAGCTGATCTCTCCGTCTAACGATCCGTGGG
 TAGTTAACAAGTGTCTCAAATCAGCCCGGACATGGGTATCCTGAAATTT
 AAATCTAGCAAATAGTGA CTGAG

SEQ ID NO: 31 (Algo V_H(CDRsWT)-C_H)

EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQIQSLREEDTAVYYCARFAIKG
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSC

SEQ ID NO: 32 (Algo V_H(CDRsWT + Treg) - C_H)

EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAIKG
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSC

5 **SEQ ID NO: 33** (deBouganina 2)

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDIT
TTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPVGTN
RVTLTFDGSYQKLVHSAEVDKDLGKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLI
VIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLHGSFKPDFKVLLENWGDISDAIHKSSPQ
CTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISPDGMILKFKSSK

SEQ ID NO: 34 (DI V_H-C_H-deBouganina 3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMG
WINTYTGESTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAI
KGDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAK
GTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWD
GKDRAVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALEL
GVNKLKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGS
FKPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQIS
10 PDMGILKFKSSK

SEQ ID NO: 35 (DI V_L-C_L-deBouganina 3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSTKSLLSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
YQMSNLAAGVPSRFSSSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGTGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC
TRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTI
ADDKRFVLVDITTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPT
VATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGVNKLKLEFSIEAIHG
KTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENN
WGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISPDGMILKFKSSK

SEQ ID NO: 36 (Algo V_H-C_H-deBouganina 3)

EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQIQSLREEDTAVYYCARFAIQG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
 VCQLPVTLLQTIADDKRFVLVDITTTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
 DRAVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGV
 NKLEFSIEAIHGKTINGQEAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
 PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVNVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 37 (Algo V_L-C_L-deBouganina 3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSTKSLHNSGITYLYWYQQKPGSAPKLLIY
 QMSHLASGVPSRFSSSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGECTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLP
 VTLQTIADDKRFVLVDITTTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVF
 LDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGVNKLEFS
 IEAIHGKTINGQEAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVL
 NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVNVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

5 **SEQ ID NO: 38** (Algo V_H(CDRsWT)-C_H-deBouganina)

EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQIQSLREEDTAVYYCARFAIKG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
 VCQLPVTLLQTIADDKRFVLVDITTTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
 DRAVFLDKVPTVATSKLFPVGTNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGV
 NKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
 PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVNVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 39 (Algo V_H(CDRsWT)-C_H-deBouganina3)

EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQIQSLREEDTAVYYCARFAIKG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
 VCQLPVTLLQTIADDKRFVLVDITTTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK

DRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
 PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 40 (Algo V_H(CDRsWT + Treg)-C_H-deBouganina)
 EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAIKG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
 VCQLPVTLLQTIADDKRFVLVDITTTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
 DRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGV
 NKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
 PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 41 (Algo V_H(CDRsWT+Treg)-C_H-deBouganina3)
 EVQLQQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAIKG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
 VCQLPVTLLQTIADDKRFVLVDITTTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
 DRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
 PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 5 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 42 (deBouganina 3)
 YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLLQTIADDKRFVLVDIT
 TTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVN
 RVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGVNKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFL
 IVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSP
 QCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 10 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 43 (deBouganina 4)
 YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLLQTIADDKRFVLVDIT
 TTSSKKTVMKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVN
 RVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELGVNKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLI
 VIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQ
 CTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 10 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 44 (DI V_H-C_H-deBouganina 4)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMG
WINTYTGESTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAI
KGDIYWGQGTLYTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAK
GTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYPQDKWD
GKDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLEL
GVNKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSF
KPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISP
DMGILKFKSSK

SEQ ID NO 45 (DI V_L-C_L-deBouganina4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRSTKSLLHSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCAQNLEIPRTFGTTGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC
TRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTI
ADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYPQDKWDGKDRAVFLDKVPT
VATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELGVNKLEFSIEAIHG
KTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENN
WGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISPD
MGILKFKSSK

5 **SEQ ID NO: 46** (Algo V_H-C_H-deBouganina 4)

EVQLQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTAYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQIQSLEEDTAVYYCARFAIQG
DYWGQGTLYTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
VCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYPQDKWDGK
DRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKP
NFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVVSQISPD
MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 47 (Algo V_L-C_L-deBouganina 4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSTKSLHLSNGITYLYWYQQKPGSAPKLLIY
QMSHLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

TRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTI
ADDKRFVLVDITTTSKKTVKV AIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPT
VATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELGVNKLEFSIEAIHG
KTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENN
WGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 48 (Algo V_H(CDRsWT)-C_H-deBouganina4)

EVQLQQSGPGLVQPGGSRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQISLREEDTAVYYCARFAIKG
DYWGQGTLYVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
VCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKV AIDVTDVYVVG YQDKWDGK

5

DRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKP
NFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 49: (Algo V_H(CDRsWT +Treg)-C_H-deBouganina4)

EVQLQQSGPGLVQPGGSRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGW
INTYTGESTYADSFKGRFEFSLDTHNSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFAIK
GDYWGQGTLYVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCTRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKG
TPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKV AIDVTDVYVVG YQDKWDG
KDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELG
VNKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 50 (WT V_H-C_H-deBouganina 3)

EVQLVQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCTRRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
 VCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
 DRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFK
 PNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 51 (WT V_H-C_H-deBouganina4)

EVQLVQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGW
 INTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKG
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCTRRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTP
 VCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGK
 DRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELGV
NKLEFSIEAIHGKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKP
 NFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 52 (WT V_L-C_L-deBouganina 3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSTKSLLSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
 YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGT
 KVELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGECTRRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVC
 QLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDR
 AVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKADRKALELGVNK
 LEFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNF
 KVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVKVSQISPD
 MGILKFKSSK

SEQ ID NO: 53 (WT V_L-C_L-deBouganina 4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSTKSLLSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI
YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGT
KVELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC
TRHRQPRGWEQKYNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTI
ADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPT
VATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVHAAKVDRKDLELGVNKLEFSIEAIHG
KTINGQEIAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENN
WGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVVNKKVSQISPDMGILKFKSSK

Listado de secuencias

- <110> Viventia Bio Inc
- 5 <120> ANTICUERPOS ANTI-EPCAM Y MÉTODOS DE USO
- <130> 11169/00002
- <150> PCT/CA2014/
- <151> 02-10-2014
- 10 <140> 61/865,817
- <141> 02-10-2013
- <140> 61/030,805
- <141> 30-07-2014
- <160> 53
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> VH-CH o DI VH-CH desinmunizado
- <400> 1

ES 2 747 273 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215

<210> 2

5 <211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> VL-CL o DI VL-CL desinmunizado

10 <400> 2

ES 2 747 273 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 3

5 <211> 356

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> toxina ETA 252-608

10 <400> 3

ES 2 747 273 T3

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

ES 2 747 273 T3

Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys
115 120 125

Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro
130 135 140

Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr
145 150 155 160

Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
165 170 175

Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
180 185 190

Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
195 200 205

Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
210 215 220

Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg
225 230 235 240

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
245 250 255

Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
260 265 270

Gly Glu Val Glu Arg Leu Leu Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
275 280 285

Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
290 295 300

Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro
305 310 315 320

Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
325 330 335

Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
340 345 350

Gly Lys Pro Pro

355

- 5 <210> 4
<211> 250
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> proteína bouganina modificada

ES 2 747 273 T3

<400> 4

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
20 25 30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
85 90 95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu
115 120 125

Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
245 250

5

<210> 5

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> VH-CH o WT VH-CH de tipo salvaje

ES 2 747 273 T3

<400> 5

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215

5

<210> 6

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> VL-CL o WT VL-CL de tipo salvaje

<400> 6

ES 2 747 273 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7

5 <211> 1588

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de VB5-845 desinmunizado

10 <400> 7

ES 2 747 273 T3

ctgcaggctct atggaacgat aaatgcccat gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa 60
 tgaaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgctgcc caaccagcga 120
 tggcggaagt acagctgggc gaatccggtg gtggtctggt tcagccgggt ggtagcctgc 180
 gtctgagctg cgcggcgagc gggtacacct tcaccgcgta cggatatgaac tgggttcgctc 240
 aggctccggg taaaggtttg gaatggatgg gttggatcaa cacctatacc ggtgagtcta 300
 cctacgctga tagcgtaaaa ggccgtttca ccatcagcgc tgacactagc aaaaacaccg 360
 cgtacctgca gatgaactct ctgcgtgctg aggacactgc ggtttactac tgcgctcggt 420
 tcgcatcaa aggtgactat tggggtcagg gtactctggt taccgtagc agcgctagca 480
 ctaagggccc gtccgttttc ccaactggctc cgtcttctaa aagcacttct ggtggtaccg 540
 cggctctggg ttgccttggt aaagactact tccctgaacc ggtcaccgtt agctggaact 600
 ccggtgctgt gacctctggt gttcacacct tcccagcggg tctgcagtct agcggctctgt 660
 atagcctgag ctctgtagtt accgttccgt cttctagcct gggtacgcag acctacatct 720
 gcaacgtgaa ccacaaaccg agcaacacta aagtggataa aaaagttgaa ccgaagtctt 780
 gctagtaatc tagagtcgac ctgcaggctct atggaacgat aaatgcccat gaaaattcta 840
 tttcaaggag acagtcataa tgaaataacct tctgccgacc gctgccgctg gtctgctgct 900
 gttggctgct caaccggcta tggcagacat ccagatgacc cagtccccgt ctagcctgag 960
 cgcaagcgtt ggtgaccgtg tgaccatcac ctgccgtagc actaaatccc tgctgcactc 1020
 taacggcatc acctacctgt attggtacca acagaaaccg ggtaaagctc cgaaactgct 1080
 gatctaccag atgtctaacc tggctagcgg cgttccttct cgtttttctt ctagcggtag 1140
 cggtagctgac ttcacctga ccattagctc tctgcagcct gaagactttg cgacctacta 1200
 ttgcgctcag aaccttgaaa tcccgctac cttcggcacc ggtaccaaag ttgaaatcaa 1260
 gcgtaccgtt gcggtccgt ctgttttcat cttccacact agcgatgaac agcttaaatc 1320
 tggtagctgt agcgtagttt gcctgcttaa caacttctac cctcgtgaag cttaaagtta 1380
 gtggaaagtt gacaacgctc tgcagtctgg taactctcag gaatctgtga ccgaacagga 1440
 tagcaaagat agcacctata gcctgtctag caccctgacc cttagcaagc cggactatga 1500
 aaaacacaaa gtttacgctt gcgaggtgac ccaccaaggt ctgtcttctc cggtgactaa 1560
 atcctttaac cgtggcgaat gctagtga 1588

<210> 8

5 <211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 4D5MOC-B

10 <400> 8

ES 2 747 273 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg Thr Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro
 115 120 125
 Thr Ala Asn Ser Gly Thr Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser
 130 135 140
 Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala
 145 150 155 160
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln
 165 170 175
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr
 180 185 190
 Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser
 195 200 205
 Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg
 210 215 220
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly
 225 230 235 240
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 9

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína bouganina modificada

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (123)..(123)
 <223> Xaa is Thr o Ala o Gln

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 5 <222> (127)..(127)
 <223> Xaa is Gly o Ala

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (129)..(129)
 10 <223> Xaa is Gln o Gly o Glu

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (133)..(133)
 <223> Xaa is Asn o Asp o Thr o Ala o Arg o Gln o Glu o Gly o His o Lys o Ser
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (152)..(152)
 <223> Xaa is Gln o Ala

 <400> 9

ES 2 747 273 T3

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
 20 25 30
 Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
 35 40 45
 Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
 50 55 60
 Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
 65 70 75 80
 Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
 85 90 95
 Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
 100 105 110
 Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Xaa Asp Arg Lys Xaa Leu
 115 120 125
 Xaa Leu Gly Val Xaa Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
 130 135 140
 Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Xaa Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
 145 150 155 160
 Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
 165 170 175
 Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
 180 185 190
 Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
 195 200 205
 Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
 210 215 220
 Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
 225 230 235 240
 Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
 245 250

<210> 10
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> VB6-845

ES 2 747 273 T3

<400> 10

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
85 90 95

Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

ES 2 747 273 T3

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Tyr Asn Thr
245 250 255

Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln
260 265 270

Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro
275 280 285

Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp
290 295 300

Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr
305 310 315 320

Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg
325 330 335

Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe
340 345 350

Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln
355 360 365

Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly
370 375 380

Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile
385 390 395 400

Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val
405 410 415

Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg
420 425 430

Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu

ES 2 747 273 T3

435		440		445
Asn 450	Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln	455		460
Cys 465	Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp	470		480
Pro Trp Val Val Asn 485	Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile	490		495
Leu Lys Phe Lys 500	Ser Ser Lys Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala	505		510
Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala 515	Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His	520		525
His His His Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala 530		535		540
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu 545		550		560
Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 565		570		575
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser 580		585		590
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 595		600		605
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys 610		615		620
Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 625		630		640
Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro 645		650		655
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu 660		665		670
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn 675		680		685

ES 2 747 273 T3

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
690 695 700

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
705 710 715 720

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
725 730 735

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
740 745 750

<210> 11

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH-CH

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

10

ES 2 747 273 T3

145					150				155				160			
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
				180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
				195					200					205		
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys						
				210					215							
<210> 12																
<211> 219																
<212> PRT																
<213> Secuencia Artificial																
<220>																
<223> Algo VL-CL																
<400> 12																
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
1					5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Thr	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30		
Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	
				35					40					45		
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	His	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	
				50					55					60		
Ser	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
65					70					75					80	
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn	
				85					90					95		
Leu	Glu	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110		
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
				115					120					125		
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
				130					135					140		

ES 2 747 273 T3

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 13

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DI VH-CH-deBouganina

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

10

ES 2 747 273 T3

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335
 Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
 340 345 350
 Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
 355 360 365
 Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
 370 375 380

ES 2 747 273 T3

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 14

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH-CH-deBouganina

<400> 14

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 747 273 T3

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
210 215 220

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
225 230 235 240

Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
245 250 255

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
340 345 350

ES 2 747 273 T3

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 15

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> WT VH-CH-deBouganina

<400> 15

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

10

ES 2 747 273 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320

ES 2 747 273 T3

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 16

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DI VL-CL-deBouganina

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

10

ES 2 747 273 T3

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285

ES 2 747 273 T3

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 17

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VL-CL-deBouganina

<400> 17

ES 2 747 273 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Thr	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	20	25	30	
Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	35	40	45	
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	His	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	50	55	60	
Ser	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	65	70	75	80
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn	85	90	95	
Leu	Glu	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	100	105	110	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	115	120	125	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	130	135	140	
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	145	150	155	160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	165	170	175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	180	185	190	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	195	200	205	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln	210	215	220	
Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Lys	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly	225	230	235	240
Glu	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Glu	Leu	245	250	255	

ES 2 747 273 T3

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 18

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> WT VL-CL-deBouganina

<400> 18

ES 2 747 273 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Thr	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	20	25	30	
Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	35	40	45	
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	50	55	60	
Ser	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	65	70	75	80
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn	85	90	95	
Leu	Glu	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Leu	Lys	100	105	110	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	115	120	125	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	130	135	140	
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	145	150	155	160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	165	170	175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	180	185	190	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	195	200	205	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln	210	215	220	

ES 2 747 273 T3

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
225 230 235 240

Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
245 250 255

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 19

<211> 788

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de DI VH-CH

<400> 19

ctgcaggctct atggaacgat aaatgcccac gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa	60
tgaaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgctgcc caaccagcga	120
tggcgggaagt acagctggtc gaatccggtg gtggtctggt tcagccgggt ggtagcctgc	180
gtctgagctg cgcggcgagc gggtacacct tcaccgcgta cggatatgaac tgggttcgctc	240
aggctccggg taaagggttg gaatggatgg gttggatcaa cacctatacc ggtgagtcta	300
cctacgctga tagcgtaaa ggccgtttca ccatcagcgc tgacacttct aaaaacaccg	360
cgtacctgca gatgaactct ctgcgtgctg aggacactgc ggtttactac tgcgctcggt	420
tcgcgatcaa aggtgactat tggggtcagg gtactctggt taccgtagc agcgctagca	480
ctaaggggccc gtccgttttc ccactggctc cgtcttctaa aagcacttct ggtggtaccg	540
cggctctggg ttgccttggt aaagactact tccctgaacc ggtcaccgtt agctggaact	600
ccggtgcggt gacctctggt gttcacacct tcccagcggg tctgcagtct agcggtctgt	660
atagcctgag ctctgtagtt accgttccgt cttctagcct gggtacgcag acctacatct	720
gcaacgtgaa ccacaaaccg agcaacacta aagtggataa aaaagttgaa ccgaagtctt	780
gctagtaa	788

<210> 20

<211> 788

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de DI VL-CL

<400> 20

ctgcaggctct atggaacgat aaatgcccac gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa	60
tgaaataacct tctgccgacc gctgccgctg gtctgctgct gttggctgct caaccggcta	120
tggcagacat ccagatgacc cagtccccgt ctagcctgag cgcaagcgtt ggtgaccgtg	180
tgaccatcac ctgccgtagc actaaatccc tgctgcactc taacggcatc acctacctgt	240
attggtacca acagaaaccg ggtaaagctc cgaaactgct gatctaccag atgtctaacc	300
tggctagcgg cgttccttct cgtttttctt ctagcggtag cggtagctgac ttcaccctga	360
ccattagctc tctgcagcct gaagactttg cgacctacta ttgcgctcag aaccttgaaa	420
tcccgcgtac cttcggcacc ggtaccaaag ttgaaatcaa gcgtaccgtt gcggctccgt	480
ctgttttcat cttccacct agcgatgaac agcttaaatac tggtagctgct agcgtagttt	540
gcctgcttaa caacttctac cctcgtgaag ctaaagttca gtggaaagt gacaacgctc	600
tgcagtctgg taactctcag gaatctgtga ccgaacagga tagcaaagat agcacctata	660
gcctgtctag caccctgacc cttagcaagg cgactatga aaaacacaaa gtttacgctt	720
gcgaggtgac ccaccaaggt ctgtcttctc cggtagctaa atcctttaac cgtggcgaat	780
gctagtga	788

<210> 21

<211> 788

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de WT VH-CH

<400> 21

ctgcaggtct atggaacgat aaatgccc at gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa	60
tgaaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgctgcc caaccagcga	120
tggcggaagt acagctgggt cagtcgggcc cgggtcttgt tcaaccgggt ggttccgttc	180
gtatctcttg cgctgcttct gggtacacgt tcaccaacta cggcatgaac tgggtcaaac	240
aggctccggg taaaggcctg gaatggatgg gctggatcaa cacctacacc ggtgaatcca	300
cctacgtga ctccttcaaa ggtcgcttca ctttctccct cgacacaagt gctagtgtgt	360
catacctcca aatcaactcg ctgcgtgcag aggatacagc agtctattac tgcgcccgtt	420
tcgctatcaa aggtgactac tggggtcaag gcacgtgct gaccgtttcc tcggctagca	480
ccaaaggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag	540
cggccctggg ctgcctgggt aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact	600
caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc tcaggactct	660
actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct	720
gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt	780
5 gttagtga	788

<210> 22

<211> 806

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Secuencia nucleótida de WT VL-CL

<400> 22

ctgcaggtct atggaacgat aaatgccc at gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa	60
tgaaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgctgcc caaccagcga	120
tggcgcacca tcatcaccat cagcatatcc agatgaccca gtccccgtcc tccttgagtg	180
cttctgttgg tgaccgtgtt accatcacct gccgttccac caaatccctc ctgcactcca	240
acggtatcac ctacctttat tgggtatcaac agaaaccggg taaagctccg aaacttctga	300
tctaccagat gtccaacctg gcttccggtg ttccgtctcg tttctccagt tctggttctg	360
gtaccgactt caccctgacc atctcttctc tgcagccgga agacttcgct acctactact	420
gcgctcagaa cctggaaatc ccgcgtacct tcggtcaggg taccaaagt gaacttaagc	480
gcactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgcacat tgatgagcag ttgaaatctg	540
gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt	600
ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca	660
gcaaggacag cacctacagc ctacagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga	720
aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga	780
gcttcaacag gggagagtgt tagtga	806

<210> 23
 <211> 794
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia nucleótida de Algo VH-CH

<400> 23
 gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag 60
 tcataatgaa atacctattg cctacggcag ccgctggatt gttattactc gctgccaac 120
 cagcgatggc ggaagtacag ctgcagcagt ccggtccggg tctggttcag ccgggtggta 180
 gcgttcgtat tagctgcgcg gcgagcgggt acaccttcac cgcgtacggt atgaactggg 240
 ttcgtcaggc tccgggtaaa gggttggaat ggatgggttg gatcaacacc tataccggtg 300
 agtctaccta cgctgatagc ttcaaaggcc gtttcgaatt tagccttgac actcacaaca 360
 gctctgcgta cctgcagatt cagtctctgc gtgaagagga cactgcgggt tactactgcg 420
 ctcgtttcgc gatccagggt gactattggg gtcagggtac tctggttacc gttagcagcg 480
 ctagcactaa gggcccgctc gttttccac tggctccgct ttctaaaagc acttctggtg 540
 gtaccgcggc tctgggttgc cttgttaaag actacttccc tgaaccggct accgtagct 600
 ggaactccgg tgcgttgacc tctggtgttc acaccttccc agcggttctg cagtctagcg 660
 gtctgtatag cctgagctct gtagttaccg ttccgtcttc tagcctgggt acgcagacct 720
 acatctgcaa cgtgaaccac aaaccgagca aactaaagt ggataaaaaa gttgaaccga 780
 10 agtcttgcta gtaa 794

<210> 24
 <211> 794
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia nucleótida de Algo VL-CL

<400> 24

ES 2 747 273 T3

tctagagtcg acctgcaggt ctatggaacg ataaatgcc atgaaaattc tatttcaagg	60
agacagtcac aatgaaatac cttctgccga ccgctgccgc tggctctgctg ctgttggtctg	120
ctcaaccggc tatggcagac atccagatga cccagtcgcc gtctagcctg agcgcaagcg	180
ttggtgaccg tgtgaccatc acctgcaaaa gcactaaatc cctgctgcac tctaacggca	240
tcacctacct gtattggtac caacagaaac cgggttctgc tccgaaactg ctgatctacc	300
agatgtctca cctggctagc ggcgttcctt ctctgttttc ttctagcggg agcggtagctg	360
acttcacctt gaccattagc tctctgcagc ctgaagactt tgcgacctac tattgcgctc	420
agaaccttga aatcccgctg accttcggcc agggtaacaa agttgaaatc aagcgtagcg	480
ttgcggtctc gtctgttttc atcttccac ctacgatga acagcttaaa tctggtactg	540
ctagcgtagt ttgcctgctt aacaacttct accctcgtga agctaaagt cagtggaaag	600
ttgacaacgc tctgcagtct ggtaactctc aggaatctgt gaccgaacag gatagcaaag	660
atagcaccta tagcctgtct agcaccctga cccttagcaa ggcggactat gaaaaacaca	720
aagtttacgc ttgcgaggtg acccaccaag gtctgtcttc tccggtgact aaatccttta	780
accgtggcga atgc	794

<210> 25

<211> 1580

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de DI VH-CH-deBouganina

<400> 25

ctgcaggtct atggaacgat aaatgcccac gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa	60
tgaaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgctgcc caaccagcga	120
tggcggaagt acagctggtc gaatccggtg gtggtctggt tcagccgggt ggtagcctgc	180
gtctgagctg cgcggcgagc gggtacacct tcaccgcgta cggatatgaac tgggttcgctc	240

10

aggctccggg taaaggtttg gaatggatgg gttggatcaa cacctatacc ggtgagtcta 300
cctacgctga tagcggttaa ggccggttca ccatcagcgc tgacacttct aaaaacaccg 360
cgtacctgca gatgaactct ctgcgtgctg aggacactgc ggtttactac tgcgctcggt 420
tcgcatcaa aggtgactat tggggtcagg gtactctggg taccgtagc agcgctagca 480
ctaagggccc gtccgttttc cactggctc cgtcttctaa aagcacttct ggtggtaccg 540
cggctctggg ttgccttggt aaagactact tccctgaacc ggtcaccgtt agctggaact 600
ccggtgcgtt gacctctggg gttcacacct tcccagcggg tctgcagtct agcggctctgt 660
atagcctgag ctctgtagtt accgttccgt cttctagcct gggtacgcag acctacatct 720
gcaacgtgaa ccacaaaccg agcaacacta aagtggataa aaaagttgaa ccgaagtctt 780
gcaccctgca ccgtcagccg cgtgggtggg aacagaaata taacaccgta tcttttaacc 840
tgggtgaggc gtatgaatac ccgaccttca tccaggacct gcgtaatgaa cttgctaaag 900
gtacccctgt ttgccagctg cctgtgacct tgcagacct cgctgatgat aaacgtttcg 960
ttctggttga cattaccacc acctccaaa aaaccgttaa agtcgcgatc gatgtgaccg 1020
acgtttacgt ggtaggttac caggataaat gggacggtaa agatcgtgcg gttttcctgg 1080
acaaagttcc gaccgtagcg acttctaaac tgttcccagg tgtgaccaac cgtgtgacct 1140
tgaccttoga cggcagctat cagaaactgg ttaacgcggc caaagctgat cgtaaagctc 1200
tcgaactggg tgtaacaaa ctggagttca gcattgaagc tatccacggt aaaaccatca 1260
acggtcaaga agcagctaaa ttcttctga tcgtgatcca gatggtagc gaagcagcgc 1320
gttttaataa cattgaaacc gaagtagttg atcgtggtct gtatggtagc ttcaaaccga 1380
acttcaaagt tcttaacctg gagaacaact ggggtgacat tagcgacgcg atccataaat 1440
cttccccgca atgcaccacc attaaccggg ctctgcagct gatctctccg tctaacgato 1500
cgtgggtagt taacaaagt tctcaaatca gcccgacat gggatatcctg aaatttaaat 1560
ctagcaaata gtgactcgag 1580

<210> 26

<211> 1586

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de Algo VH-CH-deBouganina

<400> 26

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag 60
tcataatgaa atacctattg cctacggcag ccgctggatt gttattactc gctgccaac 120
cagcgatggc ggaagtagc ctgcagcagt ccggtccggg tctgggttcag ccgggtggta 180
gcgttcgtat tagctgcgcg gcgagcgggt acaccttcac cgcgtacggt atgaactggg 240

10

ttcgtcaggc tccgggtaaa ggtttggaat ggatgggttg gatcaacacc tataccgggtg	300
agtctaccta cgctgatagc ttcaaaggcc gtttcgaatt tagccttgac actcacaaca	360
gctctgcgta cctgcagatt cagtctctgc gtgaagagga cactgcgggtt tactactgcg	420
ctcgtttcgc gatccagggt gactattggg gtcagggtac tctgggttacc gtttagcagcg	480
ctagcactaa gggcccgctc gttttcccac tggctccgtc ttctaaaagc acttctgggtg	540
gtaccgcggc tctgggttgc cttgtttaaag actacttccc tgaaccggtc accgttagct	600
ggaactccgg tgcgttgacc tctgggtgtc acaccttccc agcgggttctg cagtctagcg	660
gtctgtatag cctgagctct gtagttaccg ttccgtcttc tagcctgggt acgcagacct	720
acatctgcaa cgtgaaccac aaaccgagca aactaaagt ggataaaaaa gttgaaccga	780
agtcttgac ccgtcaccgt cagccgcgtg gttgggaaca gaaatataac accgtatctt	840
ttaacctggg tgaggcgtat gaatacccg ccttcatcca ggacctgct aatgaacttg	900
ctaaaggtag ccctgtttgc cagctgcctg tgaccctgca gaccatcgct gatgataaac	960
gtttcgttct ggttgacatt accaccacct ccaaaaaaac cgttaaagtc gcgatcgatg	1020
tgaccgacgt ttacgtggta ggttaccagg ataaatggga cggtaaagat cgtgcggttt	1080
tcctggacaa agttccgacc gtagcgactt ctaaactgtt cccagggtgtg accaaccgtg	1140
tgaccctgac cttcgacggc agctatcaga aactgggtta cgcggccaaa gctgatcgta	1200
aagctctcga actgggtgtt aacaaactgg agttcagcat tgaagctatc cacggtaaaa	1260
ccatcaacgg tcaagaagca gctaaattct tcctgatcgt gatccagatg gtttagcgaag	1320
cagcgcgttt taaatacatt gaaaccgaag tagttgatcg tgggtctgtat ggtagcttca	1380
aaccgaactt caaagttctt aacctggaga acaactgggg tgacattagc gacgcgatcc	1440
ataaatcttc cccgcaatgc accaccatta acccggtctc gcagctgac tctccgtcta	1500
acgatccgtg ggtagttaac aaagtgtctc aaatcagccc ggacatgggt atcctgaaat	1560
ttaaactctag caaatagtga ctcgag	1586

<210> 27

<211> 1580

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de WT VH-CH-deBouganina

<400> 27

ctgcaggtct atggaacgat aaatgcccat gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa	60
tgaaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgctgcc caaccagcga	120
tggcggaagt acagctgggt cagtccggcc cgggtcttgt tcaaccgggt gggtccgttc	180

10

ES 2 747 273 T3

gtatctcttg cgctgcttct ggttacacgt tcaccaacta cggcatgaac tgggtcaaac 240
aggctccggg taaaggcctg gaatggatgg gctggatcaa cacctacacc ggtgaatcca 300
cctacgctga ctccctcaaa ggtcgcttca ctttctocct cgacacaagt gctagtgtg 360
catacctcca aatcaactcg ctgctgcag aggatacagc agtctattac tgcgcccgtt 420
tcgctatcaa aggtgactac tggggcaag gcacgctgct gaccgtttcc tcggctagca 480
ccaaaggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag 540
cgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact 600
caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc tcaggactct 660
actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct 720
gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt 780
gtaccctgca ccgtcagccg cgtggttggg aacagctcta taacaccgta tcttttaacc 840
tgggtgaggg gtatgaatac ccgaccttca tccaggacct gcgtaatgaa cttgctaaag 900
gtaccctgt ttgccagctg cctgtgacct tgcagacct cgctgatgat aaacgtttcg 960
ttctggttga cattaccacc acctccaaa aaaccgttaa agtcgcgatc gatgtgaccg 1020
acgtttacgt ggtagggttac caggataaat gggacggtaa agatcgtgcg gttttcctgg 1080
acaaagtcc gaccgtagcg acttctaaac tgttcccagg tgtgaccaac cgtgtgacct 1140
tgaccttoga cggcagctat cagaaactgg ttaacgcggc caaagctgat cgtaaagctc 1200
tcgaactggg tgtaacaaa ctggagtcca gcattgaagc tatccacggt aaaacctca 1260
acggtcaaga agcagctaaa ttcttctga tcgtgatcca gatggtagc gaagcagcgc 1320
gttttaataa cattgaaacc gaagtagttg atcgtggtct gtatggtagc ttcaaaccga 1380
acttcaaagt tcttaacctg gagaacaact ggggtgacat tagcgacgcg atccataaat 1440
cttccccgca atgcaccacc attaacccgg ctctgcagct gatctctccg tctaacgatc 1500
cgtgggtagt taacaaagtg tctcaaatca gcccgacat gggatcctg aaatttaaat 1560
ctagcaaata gtgactcgag 1580

<210> 28

<211> 1580

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de DI VL-CL-deBouganina

<400> 28

ctgcaggtct atggaacgat aaatgcccat gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa 60
tgaaatacct tctgccgacc gctgccgctg gtctgctgct gttggctgct caaccggcta 120
tggcagacat ccagatgacc cagtccccgt ctagcctgag cgcaagcgtt ggtgaccgtg 180

5

10

ES 2 747 273 T3

tgaccatcac	ctgccgtagc	actaaatccc	tgctgcactc	taacggcatc	acctacctgt	240
attggtacca	acagaaaccg	ggtaaagctc	cgaacttgct	gatctaccag	atgtctaacc	300
tggctagcgg	cgttccttct	cgtttttctt	ctagcggtag	cggtagtgac	ttcacctga	360
ccattagctc	tctgcagcct	gaagactttg	cgacctacta	ttgcgctcag	aaccttgaaa	420
tcccgcgtac	cttcggcacc	ggtaccaaag	ttgaaatcaa	gcgtaccgtt	gcggctccgt	480
ctgttttcat	cttccacact	agcgatgaac	agcttaaata	tggtactgct	agcgtagttt	540
gcctgcttaa	caacttctac	cctcgtgaag	ctaaagttca	gtggaaagtt	gacaacgctc	600
tgcagctcgg	taactctcag	gaatctgtga	ccgaacagga	tagcaaagat	agcacctata	660
gcctgtctag	caccctgacc	cttagcaagg	cggactatga	aaaacacaaa	gtttacgctt	720
gcgaggtgac	ccaccaaggt	ctgtcttctc	cggtagacta	atcctttaac	cgtggcgaat	780
gcacccgta	ccgtcagccg	cgtgggtggg	aacagaaata	taacaccgta	tcttttaacc	840
tgggtgaggg	gtatgaatac	ccgaccttca	tccaggacct	gcgtaatgaa	cttgctaaag	900
gtaccctctg	ttgccagctg	cctgtgacct	tgcagacct	cgtgatgat	aaacgtttcg	960
ttctggttga	cattaccacc	acctccaaaa	aaaccgttaa	agtcgcgatc	gatgtgaccg	1020
acgtttacgt	ggtagggttac	caggataaat	gggacggtaa	agatcgtgcg	gttttcctgg	1080
acaaagtcc	gaccgtagcg	acttctaaac	tgttcccagg	tgtgaccaac	cgtgtgaccc	1140
tgaccttcga	cggcagctat	cagaaactgg	ttaacgcggc	caaagctgat	cgtaaagctc	1200
tcgaactggg	tgtaacaaaa	ctggagttca	gcattgaagc	tatccacggt	aaaaccatca	1260
acggtcaaga	agcagctaaa	ttcttcctga	tcgtgatcca	gatgggttagc	gaagcagcgc	1320
gttttaata	cattgaaacc	gaagtagttg	atcgtggtct	gtatggtagc	ttcaaaccga	1380
acttcaaagt	tcttaacctg	gagaacaact	ggggtgacat	tagcgacgcg	atccataaat	1440
cttccccgca	atgcaccacc	attaacccgg	ctctgcagct	gatctctccg	tctaacgatc	1500
cgtgggtagt	taacaaagtg	tctcaaatca	gcccggacat	gggtatcctg	aaatttaaat	1560
ctagcaaata	gtgactcgag					1580

<210> 29

<211> 1592

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de Algo VL-CL-deBouganina

<400> 29

tctagagtcg	acctgcaggt	ctatggaacg	ataaatgcc	atgaaaattc	tatttcaagg	60
------------	------------	------------	-----------	------------	------------	----

agacagtc	aatgaaatac	cttctgccga	ccgctgccgc	tggtctgctg	ctgttggtg	120
----------	------------	------------	------------	------------	-----------	-----

10

ES 2 747 273 T3

ctcaaccggc tatggcagac atccagatga cccagtcccc gtctagcctg agcgcaagcg 180
 ttggtgaccg tgtgaccatc acctgcaaaa gcactaaatc cctgctgcac tctaaccggca 240
 tcacctacct gtattggtac caacagaaac cgggttctgc tccgaaactg ctgatctacc 300
 agatgtctca cctggctagc ggcgttcctt ctctgttttc ttctagcggg agcggtagctg 360
 acttcaccct gaccattagc tctctgcagc ctgaagactt tgcgacctac tattgcgctc 420
 agaaccttga aatcccgctg accttcggcc agggtagcaa agttgaaatc aagcgtagcg 480
 ttgcggctcc gtctgttttc atcttccac ctagcgatga acagcttaaa tctggtagctg 540
 ctagcgtagt ttgcctgctt aacaacttct accctcgtga agctaaagtt cagtggaaaag 600
 ttgacaacgc tctgcagtct ggtaactctc aggaatctgt gaccgaacag gatagcaaaag 660
 atagcaccta tagcctgtct agcaccctga cccttagcaa ggcggactat gaaaaacaca 720
 aagtttacgc ttgcgaggtg acccaccaag gtctgtcttc tccggtgact aaatccttta 780
 accgtggcga atgcacccgt caccgtcagc cgcgtggttg ggaacagaaa tataacaccg 840
 tatcttttaa cctgggtgag gcgtatgaat acccgacctt catccaggac ctgcgtaatg 900
 aacttgctaa aggtacccct gtttgccagc tgcctgtgac cctgcagacc atcgctgatg 960
 ataaacgttt cgttctgggt gacattacca ccacctcaa aaaaaccgtt aaagtcgcga 1020
 tcgatgtgac cgacgtttac gtggtaggtt accaggataa atgggacggg aaagatcgtg 1080
 cggttttcct ggacaaagtt ccgaccgtag cgacttctaa actgttccca ggtgtgacca 1140
 accgtgtgac cctgaccttc gacggcagct atcagaaact ggtaaacgcg gccaaagctg 1200
 atcgtaaagc tctcgaactg ggtgttaaca aactggagtt cagcattgaa gctatccacg 1260
 gtaaaaccat caacgggtcaa gaagcagcta aattcttcct gatcgtgatc cagatggtta 1320
 gcgaagcagc gcgtttttaa tacattgaaa ccgaagtagt tgatcgtggt ctgtatggta 1380
 gcttcaaacc gaacttcaaa gttcttaacc tggagaacaa ctgggggtgac attagcgacg 1440
 cgatccataa atcttccccg caatgcacca ccattaaccc ggctctgcag ctgatctctc 1500
 cgtctaacga tccgtgggta gtaacaaaag tgtctcaaat cagcccgac atgggtatcc 1560
 tgaaatttaa atctagcaaa tagtgactcg ag 1592

<210> 30

<211> 1598

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleótida de WT VL-CL-deBouganina

<400> 30

ctgcaggctc atggaacgat aaatgcccac gaaaattcta tttcaaggag acagtcataa 60
 tgaaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgtgcc caaccagcga 120

10

ES 2 747 273 T3

tggcgcacca tcatcaccat cagatatcc agatgacca gtccccgtcc tccctgagtg 180
 cttctgttgg tgaccgtgtt accatcacct gccgttcac caaatccctc ctgcactcca 240
 acggtatcac ctacctttat tggatatcaac agaaaccggg taaagctccg aaactttctga 300
 tctaccagat gtccaacctg gcttccggtg ttccgtctcg tttctccagt tctggttctg 360
 gtaccgactt caccctgacc atctcttctc tgcagccgga agacttcgct acctactact 420
 gcgctcagaa cctggaaatc ccggtacct tcggtcaggg taccaaagt gaacttaagc 480
 gcactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg 540
 gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt 600
 ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca 660
 gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga 720
 aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcggcc gtcacaaaga 780
 gcttcaacag gggagagtgt acccgtcacc gtcagccgcg tggttgggaa cagctctata 840
 acaccgtatc ttttaacctg ggtgaggcgt atgaataccc gaccttcac caggacctgc 900
 gtaatgaact tgctaaaggt acccctgttt gccagctgcc tgtgaccctg cagaccatcg 960
 ctgatgataa acgtttcgtt ctggttgaca ttaccaccac ctccaaaaaa accgttaaag 1020
 tcgcatcgca tgtgaccgac gtttacgtgg taggttacca ggataaatgg gacggtaaag 1080
 atcgtgcggt tttcctggac aaagttccga ccgtagcgac ttctaaactg ttcccagggtg 1140
 tgaccaaccg tgtgaccctg accttcgacg gcagctatca gaaactgggt aacgcggcca 1200
 aagctgatcg taaagctctc gaactgggtg ttaacaaact ggagttcagc attgaagcta 1260
 tccacggtaa aaccatcaac ggtcaagaag cagctaaatt ctctctgatc gtgatccaga 1320
 tggtttagca agcagcgcggt tttaaatata ttgaaaccga agtagttgat cgtggtctgt 1380
 atggtagctt caaacccaac ttcaaagttc ttaacctgga gaacaactgg ggtgacatta 1440
 gcgacgcgat ccataaatct tcccgcgaat gcaccacat taaccgggt ctgcagctga 1500
 tctctccgtc taacgatccg tgggtagtta acaaagtgtc tcaaatacag ccggacatgg 1560
 gtatcctgaa atttaaactc agcaaatagt gactcgag 1598

<210> 31

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH (CDRsWT) -CH

<400> 31

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

10

ES 2 747 273 T3

1	5	10	15
Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Glu Phe Ser Leu Asp Thr His Asn Ser Ser Ala Tyr	65	70	75
Leu Gln Ile Gln Ser Leu Arg Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala	115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	130	135	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu	180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr	195	200	205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	210	215	

<210> 32

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH(CDRsWT + Treg) - CH

<400> 32

ES 2 747 273 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Val	Arg	Ile	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	His	Asn	Ser	Ser	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Lys	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	115	120	125	
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	130	135	140	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	180	185	190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	195	200	205	
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215							

<210> 33

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> deBouganina 2

<400> 33

ES 2 747 273 T3

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
20 25 30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
85 90 95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ser Ala Glu Val Asp Arg Lys Asp Leu
115 120 125

Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu His Gly Ser Phe Lys Pro Asp Phe Lys Val Leu
180 185 190

Asp Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
245 250

<210> 34

5 <211> 481

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DI VH-CH-deBouganina 3

10 <400> 34

ES 2 747 273 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Lys	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	115	120	125	
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	130	135	140	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	180	185	190	

ES 2 747 273 T3

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335
 Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350
 Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
 355 360 365
 Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
 370 375 380
 Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
 385 390 395 400
 Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
 405 410 415
 Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
 420 425 430
 Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
 435 440 445
 Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
 450 455 460
 Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
 465 470 475 480

Lys

<210> 35

ES 2 747 273 T3

<211> 481
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> DI VL-CL-deBouganina 3

<400> 35
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

ES 2 747 273 T3

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335
 Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350
 Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
 355 360 365
 Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
 370 375 380
 Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
 385 390 395 400
 Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
 405 410 415

ES 2 747 273 T3

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 36

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH-CH-deBouganina 3

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

10

ES 2 747 273 T3

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240

Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
 355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
 370 375 380

ES 2 747 273 T3

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 37

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VL-CL-deBouganina 3

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

10

ES 2 747 273 T3

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240

Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350

ES 2 747 273 T3

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 38

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH(CDRsWT)-CH-deBouganina

<400> 38

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

10

ES 2 747 273 T3

Lys Gly Arg Phe Glu Phe Ser Leu Asp Thr His Asn Ser Ser Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Gln Ser Leu Arg Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320

ES 2 747 273 T3

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 39

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH(CDRsWT)-CH-deBouganina3

<400> 39

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

10

ES 2 747 273 T3

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
	35						40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	His	Asn	Ser	Ser	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Ile	Gln	Ser	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Lys	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105						110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130					135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170						175
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185						190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln
	210					215					220				
Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Lys	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly
225					230					235					240
Glu	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Glu	Leu
				245					250					255	
Ala	Lys	Gly	Thr	Pro	Val	Cys	Gln	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gln	Thr	Ile
			260					265						270	
Ala	Asp	Asp	Lys	Arg	Phe	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys
	275						280					285			

ES 2 747 273 T3

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 40

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH(CDRsWT + Treg)-CH-deBouganina

<400> 40

ES 2 747 273 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Val	Arg	Ile	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	His	Asn	Ser	Ser	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Lys	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	115	120	125	
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	130	135	140	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	180	185	190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	195	200	205	
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln	210	215	220	
Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Lys	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly	225	230	235	240
Glu	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Glu	Leu	245	250	255	

ES 2 747 273 T3

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 41

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH(CDRsWT+Treg)-CH-deBouganina3

<400> 41

ES 2 747 273 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Val	Arg	Ile	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	His	Asn	Ser	Ser	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Lys	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	115	120	125	
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	130	135	140	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	180	185	190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	195	200	205	
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln	210	215	220	

ES 2 747 273 T3

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240

Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
 355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
 370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
 385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
 405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
 420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
 435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
 450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
 465 470 475 480

Lys

<210> 42

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 747 273 T3

<223> deBouganina 3

<400> 42

```

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1          5          10          15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
          20          25          30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
          35          40          45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
          50          55          60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
65          70          75          80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
          85          90          95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
          100          105          110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu
          115          120          125

Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
          130          135          140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
145          150          155          160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
          165          170          175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
          180          185          190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
          195          200          205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
          210          215          220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
225          230          235          240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
5          245          250

```

<210> 43

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> deBouganina 4

ES 2 747 273 T3

<400> 43

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
20 25 30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
85 90 95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu
115 120 125

Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
245 250

5

<210> 44

<211> 481

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> DI VH-CH-deBouganina 4

ES 2 747 273 T3

<400> 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

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

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

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

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

ES 2 747 273 T3

Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335
 Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350

ES 2 747 273 T3

Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 45

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> DI VL-CL-deBouganina4

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

10

ES 2 747 273 T3

Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320

ES 2 747 273 T3

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
340 345 350

Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 46

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH-CH-deBouganina 4

<400> 46

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

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

10

ES 2 747 273 T3

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
	35						40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	His	Asn	Ser	Ser	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Ile	Gln	Ser	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Gln	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105						110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130					135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln
	210					215					220				
Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Lys	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly
225					230					235					240
Glu	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Glu	Leu
				245					250					255	
Ala	Lys	Gly	Thr	Pro	Val	Cys	Gln	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gln	Thr	Ile
			260					265					270		
Ala	Asp	Asp	Lys	Arg	Phe	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys
	275						280					285			

ES 2 747 273 T3

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
340 345 350

Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 47

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VL-CL-deBouganina 4

<400> 47

ES 2 747 273 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255

ES 2 747 273 T3

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
340 345 350

Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 48

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Algo VH(CDRsWT)-CH-deBouganina4

<400> 48

ES 2 747 273 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Val	Arg	Ile	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	His	Asn	Ser	Ser	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Ile	Gln	Ser	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Lys	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
			130				135				140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195					200					205				
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln	
	210					215					220					

ES 2 747 273 T3

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240

Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350

Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
 355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
 370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
 385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
 405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
 420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
 435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
 450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
 465 470 475 480

Lys

5 <210> 49
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 747 273 T3

<220>

<223> Algo VH(CDRsWT +Treg)-CH-deBouganina4

<400> 49

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

ES 2 747 273 T3

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335
 Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350
 Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
 355 360 365
 Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
 370 375 380
 Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
 385 390 395 400
 Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
 405 410 415
 Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
 420 425 430
 Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
 435 440 445
 Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
 450 455 460
 Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
 465 470 475 480

Lys

<210> 50

ES 2 747 273 T3

<211> 481
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> WT VH-CH-deBouganina 3

<400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

ES 2 747 273 T3

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln
210 215 220

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
225 230 235 240

Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
245 250 255

Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
260 265 270

Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
275 280 285

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
290 295 300

Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
305 310 315 320

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
340 345 350

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

ES 2 747 273 T3

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 51

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> WT VH-CH-deBouganina4

<400> 51

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

10

ES 2 747 273 T3

Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
130						135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195				200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln
210						215					220				
Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Lys	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly
225					230					235					240
Glu	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Glu	Leu
			245					250					255		
Ala	Lys	Gly	Thr	Pro	Val	Cys	Gln	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gln	Thr	Ile
			260					265					270		
Ala	Asp	Asp	Lys	Arg	Phe	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys
275						280					285				
Lys	Thr	Val	Lys	Val	Ala	Ile	Asp	Val	Thr	Asp	Val	Tyr	Val	Val	Gly
290					295					300					
Tyr	Gln	Asp	Lys	Trp	Asp	Gly	Lys	Asp	Arg	Ala	Val	Phe	Leu	Asp	Lys
305					310					315					320
Val	Pro	Thr	Val	Ala	Thr	Ser	Lys	Leu	Phe	Pro	Gly	Val	Thr	Asn	Arg
			325						330					335	
Val	Thr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Ser	Tyr	Gln	Lys	Leu	Val	His	Ala	Ala
			340					345					350		
Lys	Val	Asp	Arg	Lys	Asp	Leu	Glu	Leu	Gly	Val	Asn	Lys	Leu	Glu	Phe
355						360					365				
Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	His	Gly	Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala
370					375					380					

ES 2 747 273 T3

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 52

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> WT VL-CL-deBouganina 3

<400> 52

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

10

ES 2 747 273 T3

Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Arg His Arg Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Lys Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu
 245 250 255
 Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile
 260 265 270
 Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
 275 280 285
 Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly
 290 295 300
 Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 325 330 335
 Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
 340 345 350

ES 2 747 273 T3

Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

<210> 53

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> WT VL-CL-deBouganina 4

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

10

ES 2 747 273 T3

Ser	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	65	70	75	80
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn	85	90	95	
Leu	Glu	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Leu	Lys	100	105	110	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	115	120	125	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	130	135	140	
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	145	150	155	160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	165	170	175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	180	185	190	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	195	200	205	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Thr	Arg	His	Arg	Gln	210	215	220	
Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Lys	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly	225	230	235	240
Glu	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Thr	Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Glu	Leu	245	250	255	
Ala	Lys	Gly	Thr	Pro	Val	Cys	Gln	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gln	Thr	Ile	260	265	270	
Ala	Asp	Asp	Lys	Arg	Phe	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	275	280	285	
Lys	Thr	Val	Lys	Val	Ala	Ile	Asp	Val	Thr	Asp	Val	Tyr	Val	Val	Gly	290	295	300	
Tyr	Gln	Asp	Lys	Trp	Asp	Gly	Lys	Asp	Arg	Ala	Val	Phe	Leu	Asp	Lys	305	310	315	320

ES 2 747 273 T3

Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
325 330 335

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val His Ala Ala
340 345 350

Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe
355 360 365

Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
370 375 380

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe
405 410 415

Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
420 425 430

Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro
435 440 445

Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys
450 455 460

Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
465 470 475 480

Lys

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) que comprende:
 - (i) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2; o
 - 5 (ii) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12.
2. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a EpCAM, unido a una molécula efectora, en donde el anticuerpo comprende
 - 10 (i) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2; o
 - (ii) una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, o el inmunoconjugado según la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos de anticuerpos biespecíficos.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, o el inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo Fab y en donde la cadena ligera y la cadena pesada están unidas por un enlace covalente, opcionalmente en donde el enlace covalente es un enlace disulfuro.
5. El inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la molécula efectora se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un agente antineoplásico, un inmunomodulador, un modificador de la respuesta biológica, lectina, una toxina, un cromóforo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un ion metálico y cualquier combinación de los mismos.
6. El inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la molécula efectora es una toxina seleccionada del grupo que consiste en abrina, modecina, viscumina, gelonina, bouganina, saporina, ricina, cadena de ricina A, briodina, lufina, momordina, restrictocina, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina pertusis, toxina tetánica, toxina botulínica, toxina de Shigella, toxina del cólera, toxina de la difteria y cualquier combinación de las mismas.
7. El inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la molécula efectora es la exotoxina A de *Pseudomonas* (SEQ ID NO: 3), la toxina bouganina (SEQ ID NO: 4) o la toxina bouganina seleccionada de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43.
8. Una composición que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 o 6, o un inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, y un excipiente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable.
9. El inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, o la composición según la reivindicación 8, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.
10. El inmunoconjugado o composición para uso según la reivindicación 9, en donde el inmunoconjugado o composición está en una forma para administración parenteral seleccionada del grupo que consiste en inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracavitaria, intratecal, intratumoral, transdérmica e intravenosa.
11. El inmunoconjugado o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde el inmunoconjugado está en una forma de dosificación de 0,01 mg/kg/dosis a 2.000 mg/kg/dosis.
12. El inmunoconjugado o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende además el uso de uno o más agentes anticancerígenos y en donde los agentes anticancerígenos se coadministran, se administran simultáneamente o se administran secuencialmente con el inmunoconjugado, opcionalmente en donde los agentes anticancerígenos se seleccionan de tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, acetato de megestrol, anastrozol, letrozol, borazol, exemestano, flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona, acetato de goserelina, luprolida, finasterida, herceptina, metotrexato, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina, mitramicina, cisplatino, carboplatino, melfalán, clorambucilo, busulfán, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, tiotefán, vincristina, taxol, taxotere, etopósido, tenipósido, amsacrina, Irinotecán, topotecán, epotilonas, Iressa, Tarceva, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de EGF, inhibidores de VEGF, inhibidores de CDK, citoquinas, inhibidores de Her1 y Her2, y anticuerpos monoclonales.

13. El inmunoconjugado o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, páncreas y próstata.

5 14. Un método para detectar o monitorizar el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra de ensayo tomada del sujeto con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 o 6, para formar un complejo anticuerpo-antígeno;
- medir la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno en la muestra de ensayo; y
- normalizar los resultados frente a un control.

10 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 o 6 para uso en un método de imagenaría de un tumor en un sujeto, comprendiendo el método:

- administrar al sujeto el anticuerpo y
- detectar el anticuerpo mediante imagenaría *in vivo*, opcionalmente en donde el anticuerpo comprende además una molécula efectora seleccionada del grupo que consiste en un radioisótopo, un cromóforo, un fluoróforo, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un ion metálico y cualquier combinación de los mismos.

15 16. El anticuerpo para uso según la reivindicación 15, en donde la imagenaría *in vivo* se selecciona del grupo que consiste en imagenaría por fluorescencia de infrarrojo cercano (NIRF), imagenaría por reflectancia de fluorescencia (FRI), tomografía mediada por fluorescencia (FMT), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), imagenaría por resonancia magnética (MRI), PET con imagenaría por tomografía computarizada concurrente (PET/CT), PET con imagenaría por resonancia magnética concurrente (PET/MRI), y cualquier combinación de los mismos.

20

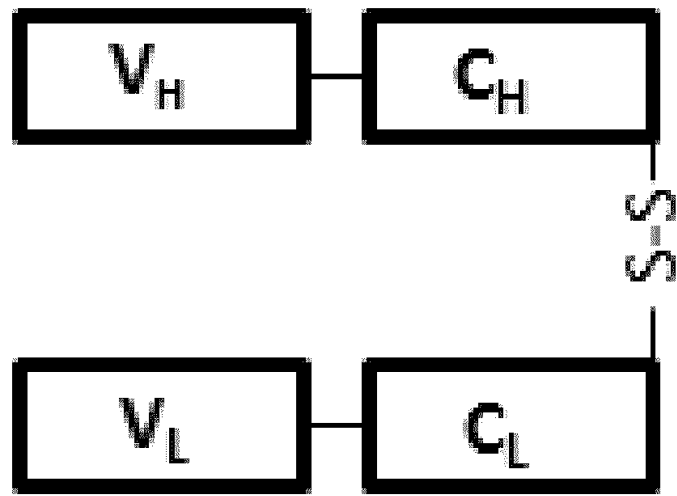


FIG. 1

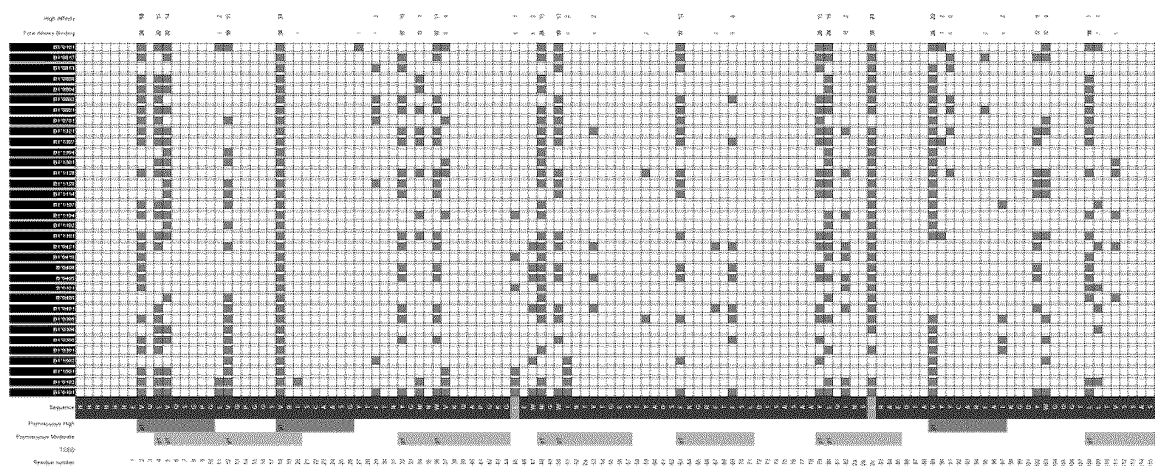
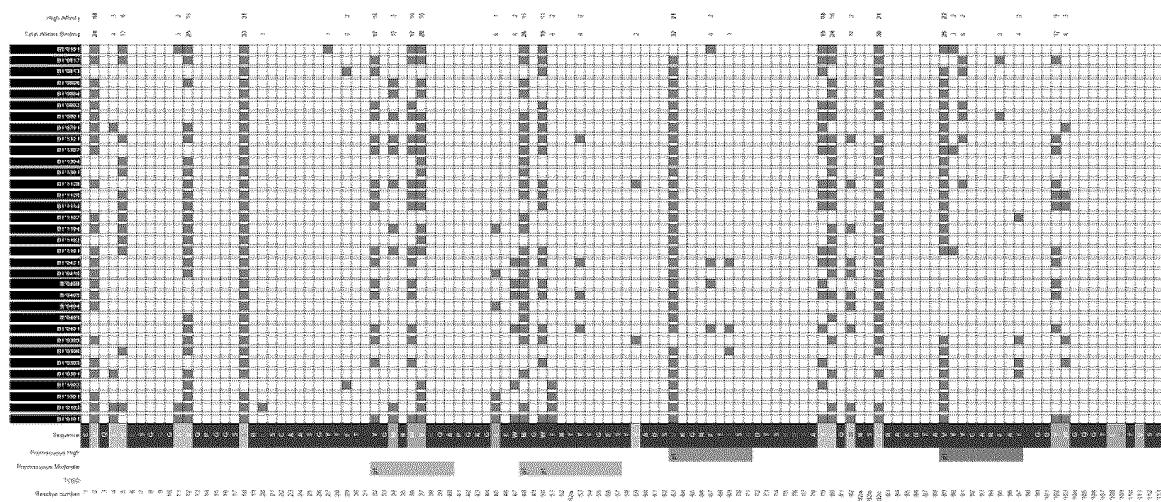


FIG. 2



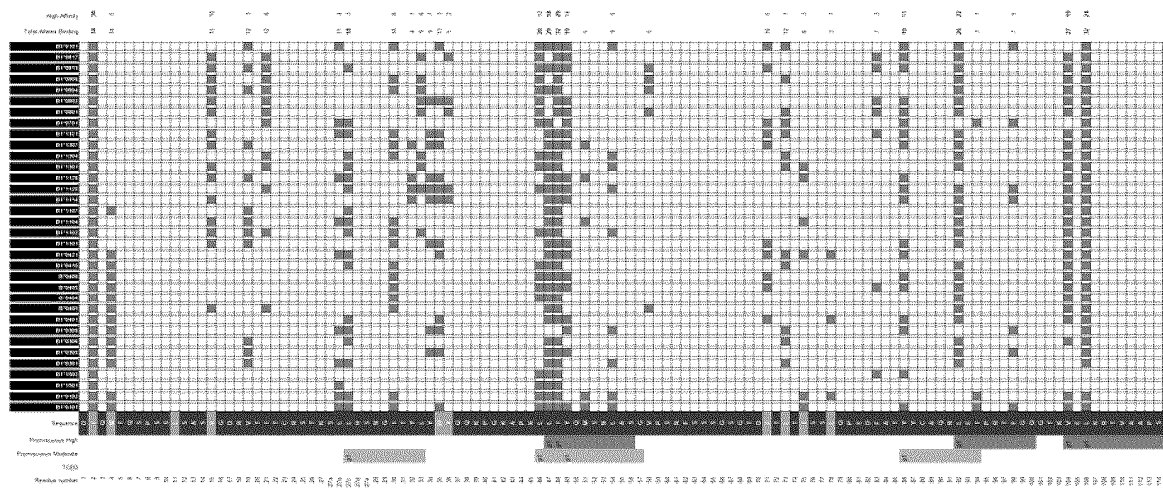


FIG. 4

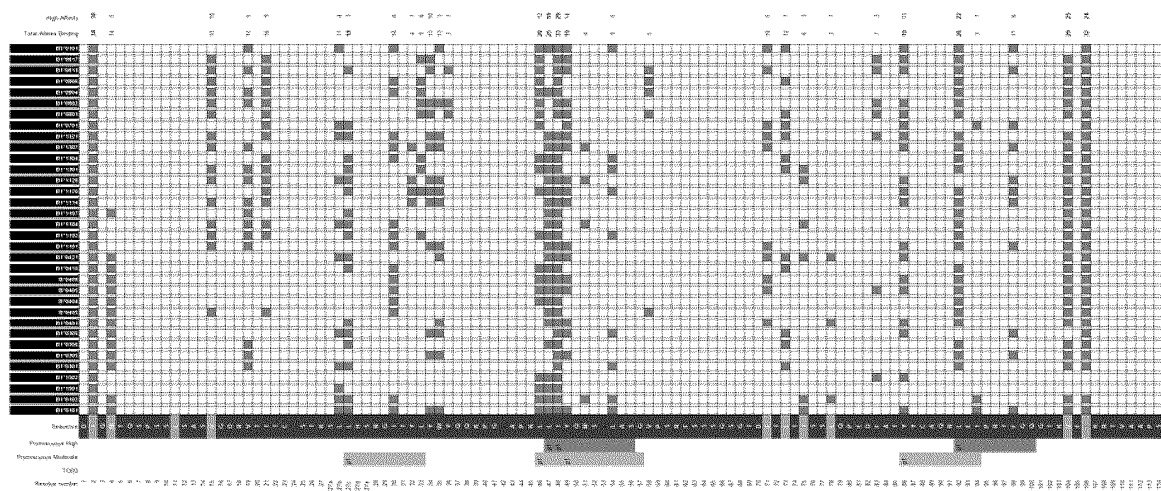


FIG. 5



FIG. 6

	Conc. (ng/mL)	Veces de Incremento (Media $\pm$ SE.)	
		Cal-27	A-375
VB5-845-DI	7,8125	20,815 $\pm$ 0,0938	0,939 $\pm$ 0,00832
	125	204,543 $\pm$ 6,437	0,987 $\pm$ 0,0129
VB5-845 WT	7,8125	39,796 $\pm$ 1,253	0,940 $\pm$ 0,0416
	31,25	112,918 $\pm$ 0,509	0,961 $\pm$ 0,00454
	125	314,829 $\pm$ 1,416	0,978 $\pm$ 0,0129

FIG. 7

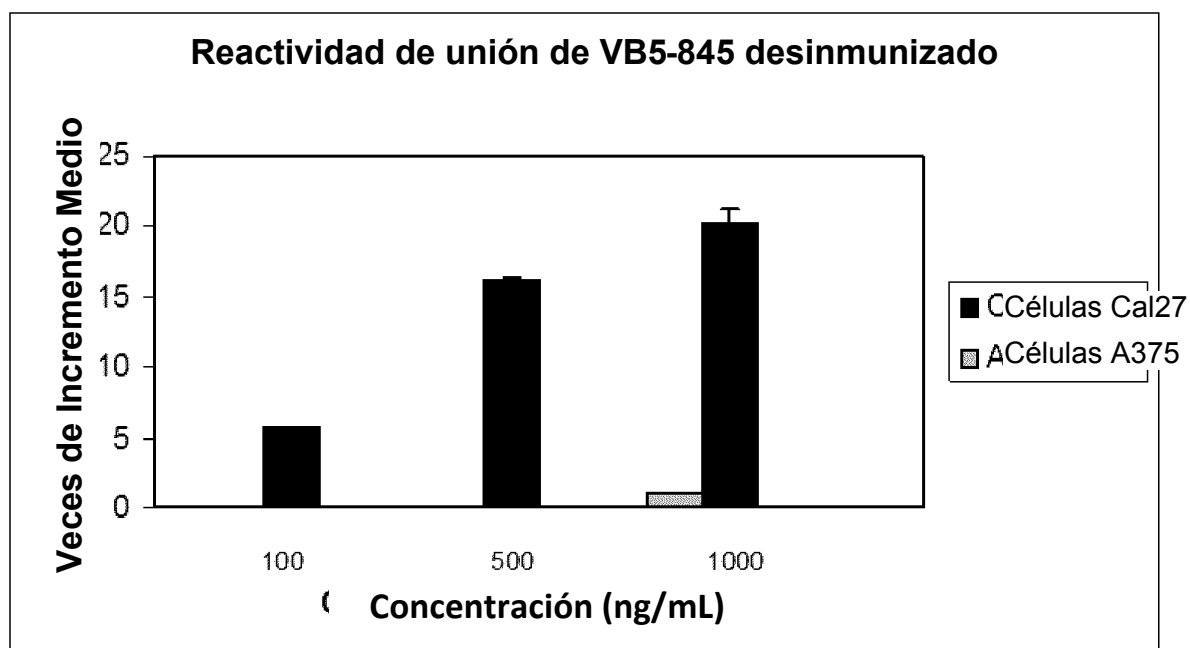
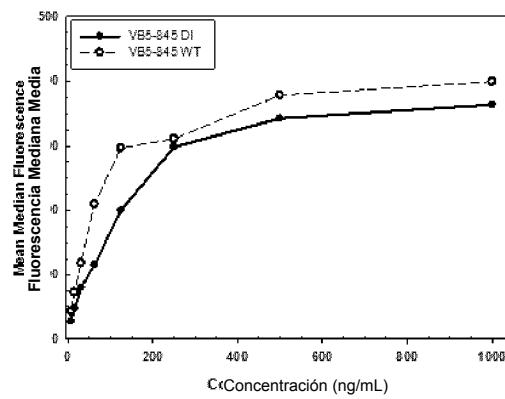
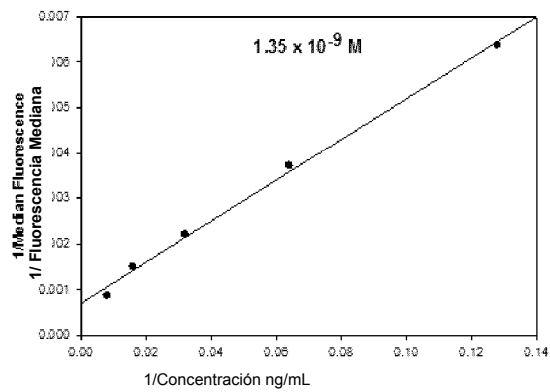


FIG. 8

Curvas de titulación de VB5-845-DI y VB5-845-WT ;
frente a CAL-27



Afinidad de VB5-845-DI frente a células Cal-27



Afinidad de VB5-845-WT frente a células Cal-27

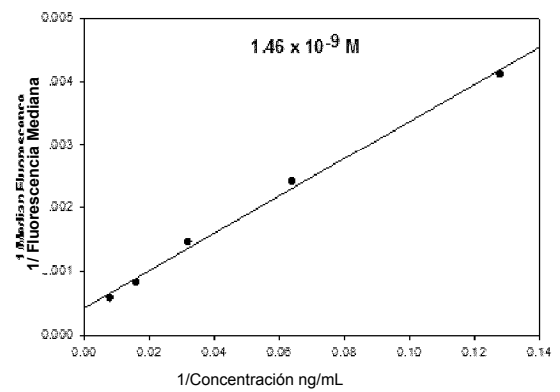


FIG. 9

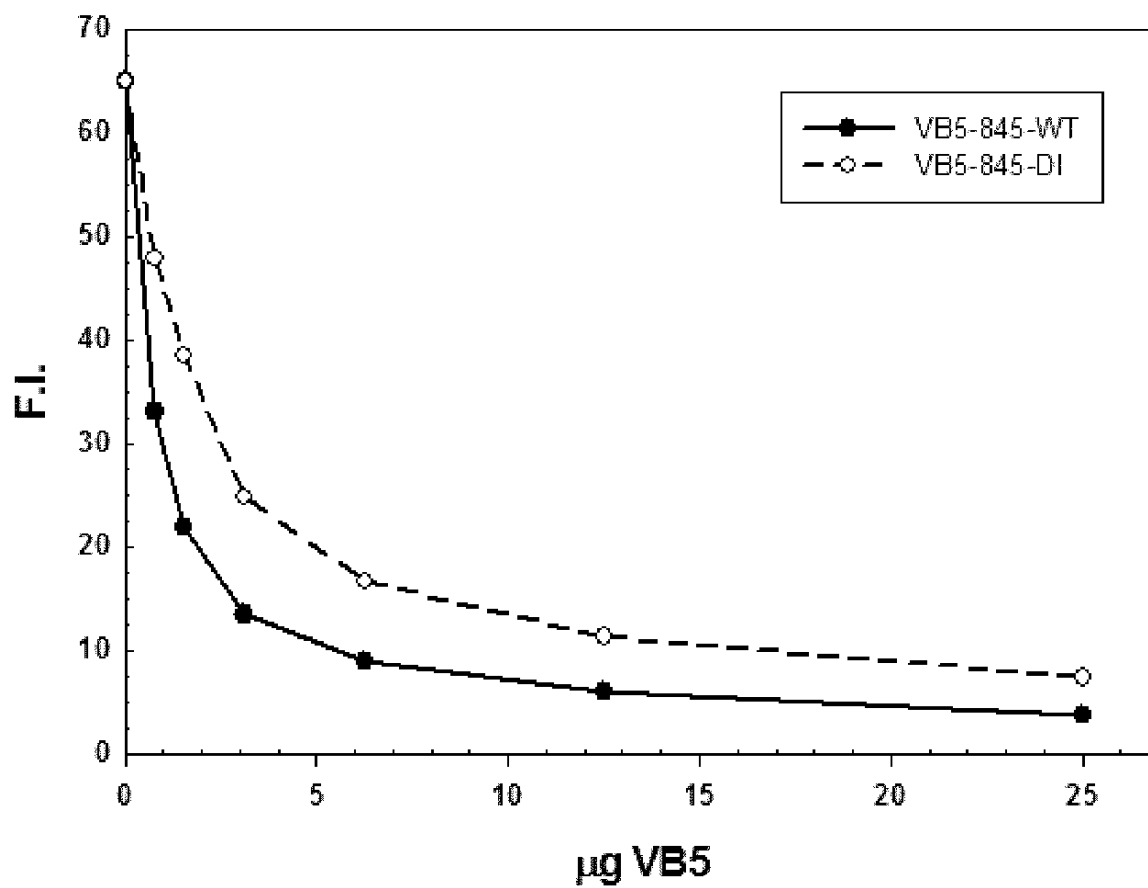
Competición de VB6-845 con VB5-845

FIG. 10

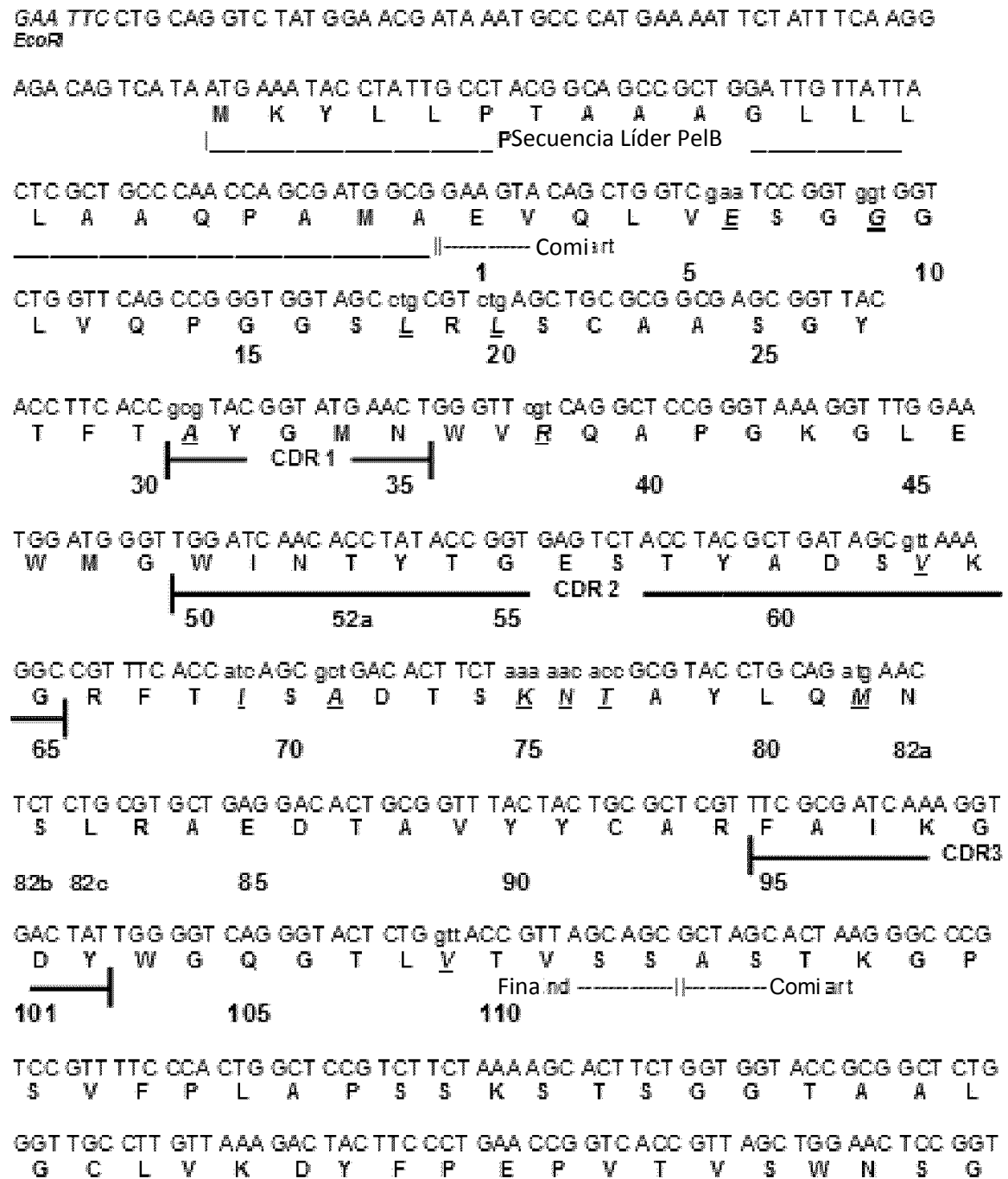


FIG. 11

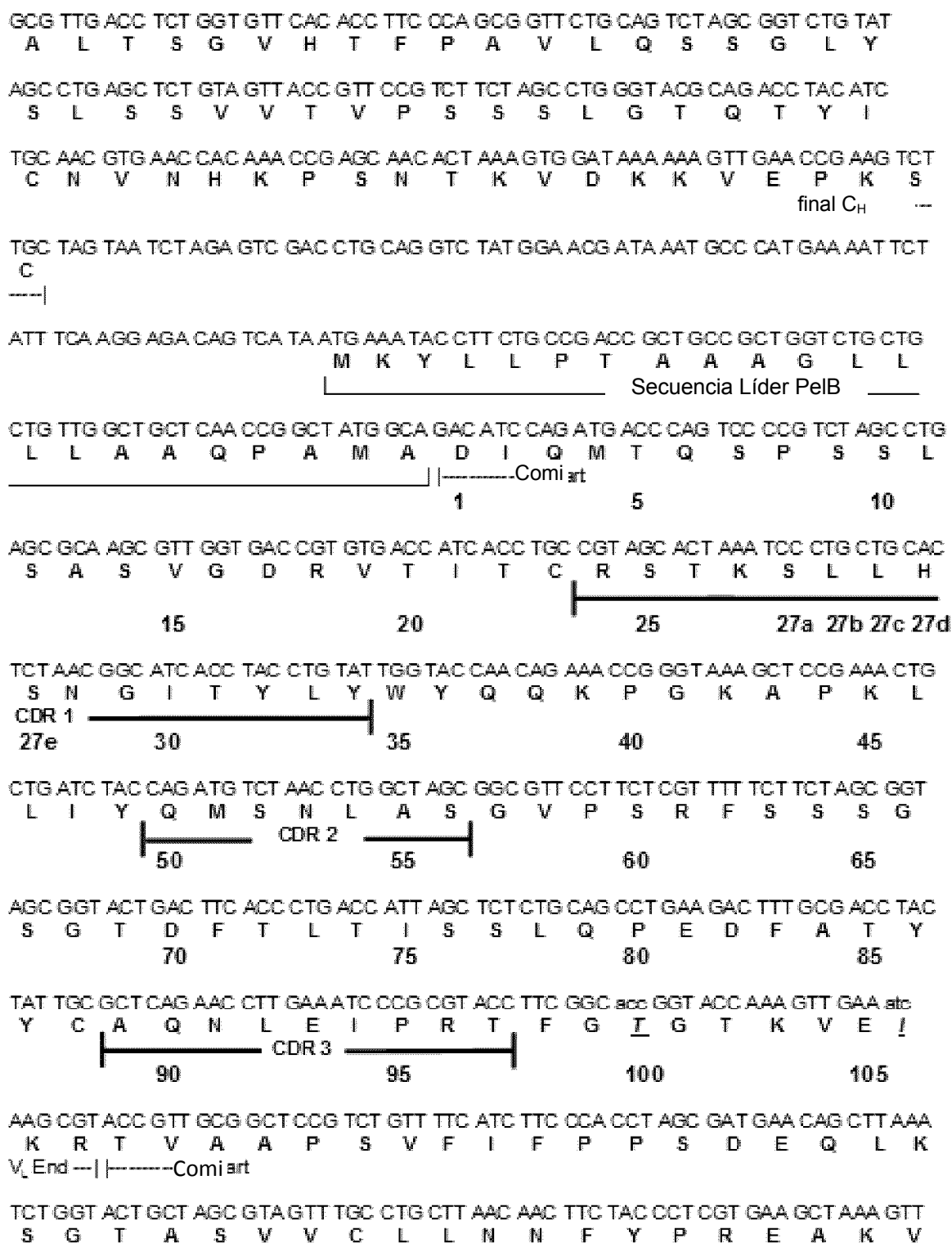


FIG. 11 continuación

CAG TGG AAA GTT GAC AAC GCT CTG CAG TCT GGT AAC TCT CAG GAA TCT GTG ACC GAA
 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E
 CAG GAT AGC AAA GAT AGC ACC TAT AGC CTG TCT AGC ACC CTG ACC CTT AGC AAG GCG
 Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A
 GAC TAT GAA AAA CAC AAA GTT TAC GCT TGC GAG GTG ACC CAC CAA GGT CTG TCT TCT CCG
 D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
 GTG ACT AAATCC TTT AAC CGT GGC GAATGC TAG TGA CTC GAG
 V T K S F N R G E C *XhoI*
 Final C_L ----|

FIG. 11 continuación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V _H -WT	E	V	Q	L	V	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	G	G	S	V	R	I
V _H - desinmunizado	E	V	Q	L	V	<u>E</u>	S	G	<u>G</u>	G	L	V	Q	P	G	G	S	<u>L</u>	R	<u>L</u>
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
V _H -WT	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	M	N	W	V	K	Q	A
V _H - desinmunizado	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	<u>A</u>	Y	G	M	N	W	V	<u>R</u>	Q	A
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59
V _H -WT	P	G	K	G	L	E	W	M	G	W	I	N	T	Y	T	G	E	S	T	Y
V _H - desinmunizado	P	G	K	G	L	E	W	M	G	W	I	N	T	Y	T	G	E	S	T	Y
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
V _H -WT	A	D	S	F	K	G	R	F	T	F	S	L	D	T	S	A	S	A	A	Y
V _H - desinmunizado	A	D	S	<u>V</u>	K	G	R	F	T	<u>I</u>	S	<u>A</u>	D	T	S	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	A	Y
	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
V _H -WT	L	Q	I	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	F	A
V _H - desinmunizado	L	Q	<u>M</u>	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	F	A
	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113				
V _H -WT	I	K	G	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	T	V	S	S				
V _H - desinmunizado	I	K	G	D	Y	W	G	Q	G	T	L	<u>V</u>	T	V	S	S				

FIG. 12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
V _L -WT	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V
V _L - desinmunizado	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c
V _L -WT	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	T	K	S	L	L
V _L - desinmunizado	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	T	K	S	L	L
	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
V _L -WT	H	S	N	G	I	T	Y	L	Y	W	Y	Q	Q	K	P
V _L - desinmunizado	H	S	N	G	I	T	Y	L	Y	W	Y	Q	Q	K	P
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
V _L -WT	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Q	M	S	N	L	A
V _L - desinmunizado	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Q	M	S	N	L	A
	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
V _L -WT	S	G	V	P	S	R	F	S	S	S	G	S	G	T	D
V _L - desinmunizado	S	G	V	P	S	R	F	S	S	S	G	S	G	T	D
	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
V _L -WT	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T
V _L - desinmunizado	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T
	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
V _L -WT	Y	Y	C	A	Q	N	L	E	I	P	R	T	F	G	Q
V _L - desinmunizado	Y	Y	C	A	Q	N	L	E	I	P	R	T	F	G	<u>I</u>
	101	102	103	104	105	106	107	108							
V _L -WT	G	T	K	V	E	L	K	R							
V _L - desinmunizado	G	T	K	V	E	<u>I</u>	K	R							

FIG. 12 continuación

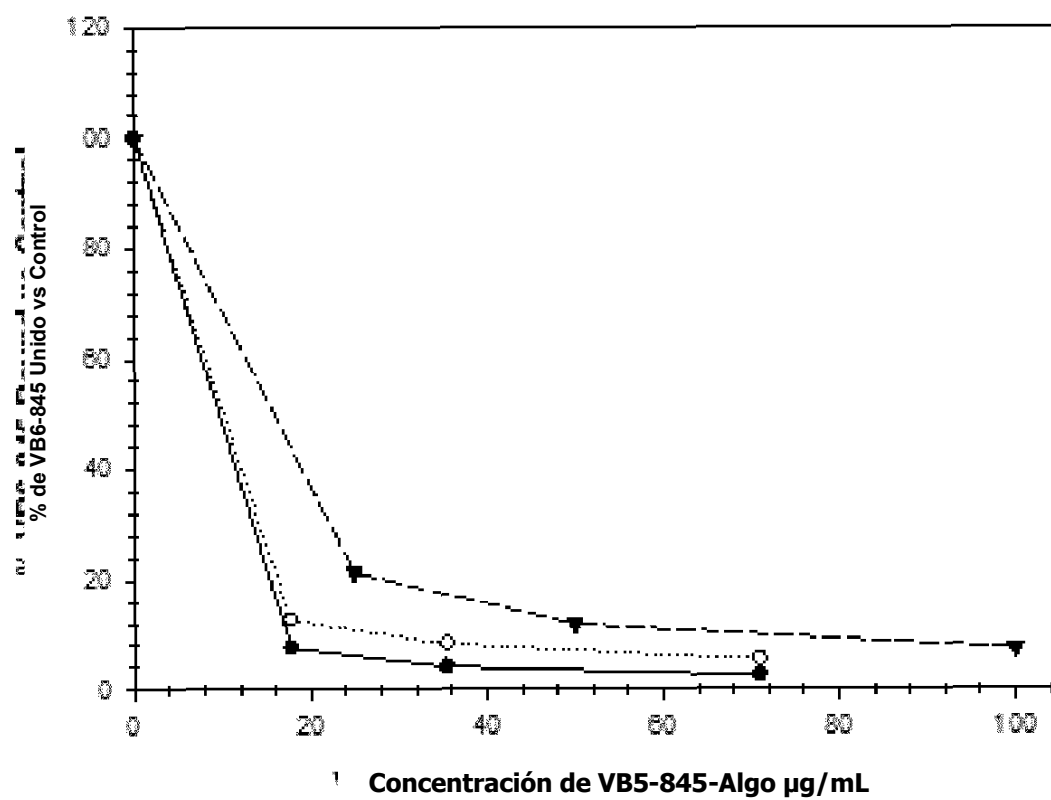


FIG. 13

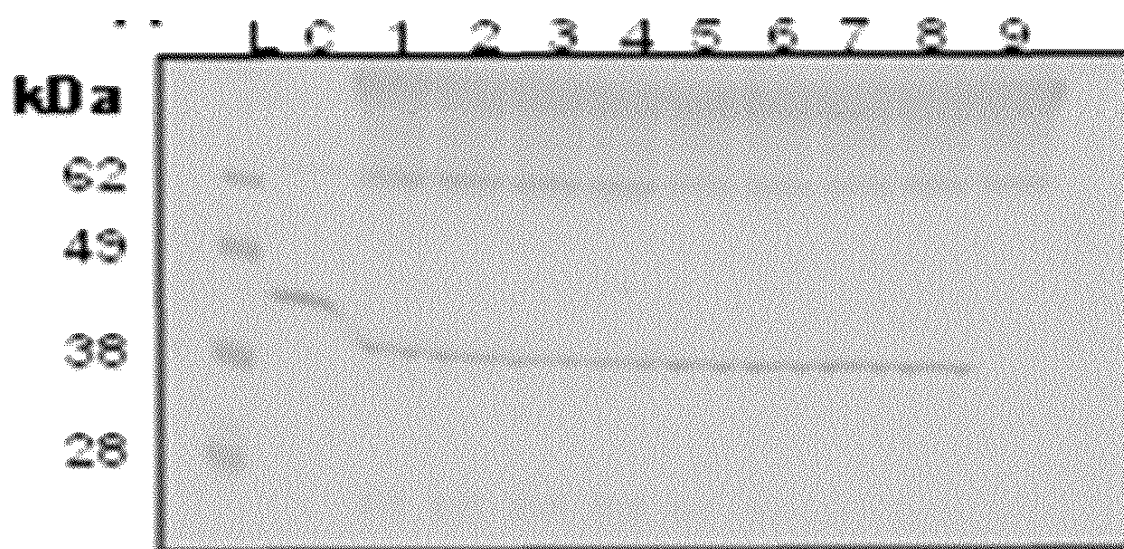


FIG. 14

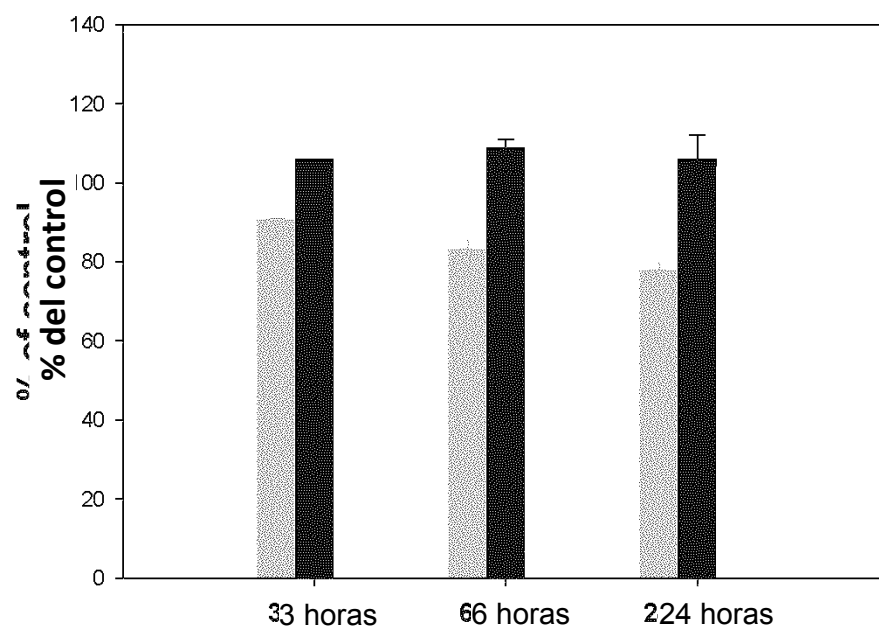


FIG. 15

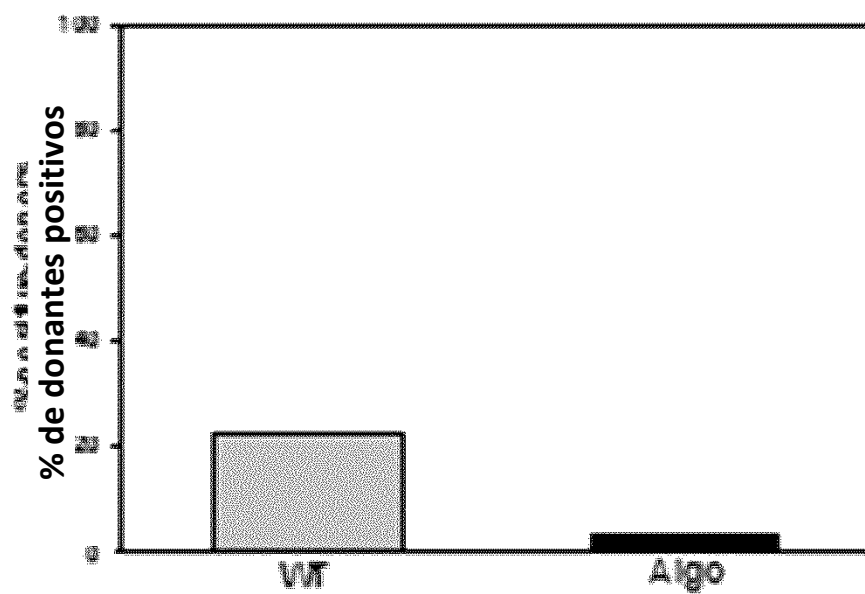


FIG. 16

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V _H -MOCB	E	V	Q	L	V	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	G	G	S	V	R	I
V _H -Algo	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	G	G	S	V	R	I
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
V _H -MOCB	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	M	N	W	V	K	Q	A
V _H -Algo	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	A	Y	G	M	N	W	V	R	Q	A
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59
V _H -MOCB	P	G	K	G	L	E	W	M	G	W	I	N	T	Y	T	G	E	S	T	Y
V _H -Algo	P	G	K	G	L	E	W	M	G	W	I	N	T	Y	T	G	E	S	T	Y
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
V _H -MOCB	A	D	S	F	K	G	R	F	T	F	S	L	D	T	S	A	S	A	A	Y
V _H -Algo	A	D	S	F	K	G	R	F	E	F	S	L	D	T	H	N	S	S	A	Y
	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
V _H -MOCB	L	Q	I	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	F	A
V _H -Algo	L	Q	I	Q	S	L	R	E	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	F	A
	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113				
V _H -MOCB	I	K	G	D	Y	W	G	Q	G	T	L	L	T	V	S	S				
V _H -Algo	I	K	G	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S				

FIG. 17

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
V _L -MOCB	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V
V _L -Algo	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c
V _L -MOCB	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	T	K	S	L	L
V _L -Algo	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	T	K	S	L	L
	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
V _L -MOCB	H	S	N	G	I	T	Y	L	Y	W	Y	Q	Q	K	P
V _L -Algo	H	S	N	G	I	T	Y	L	Y	W	Y	Q	Q	K	P
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
V _L -MOCB	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Q	M	S	N	L	A
V _L -Algo	G	S	A	P	K	L	L	I	Y	Q	M	S	H	L	A
	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
V _L -MOCB	S	G	V	P	S	R	F	S	S	S	G	S	G	T	D
V _L -Algo	S	G	V	P	S	R	F	S	S	S	G	S	G	T	D
	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
V _L -MOCB	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T
V _L -Algo	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T
	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
V _L -MOCB	Y	Y	C	A	Q	N	L	E	I	P	R	T	F	G	Q
V _L -Algo	Y	Y	C	A	Q	N	L	E	I	P	R	T	F	G	Q
	101	102	103	104	105	106	107	108							
V _L -MOCB	G	T	K	V	E	L	K	R							
V _L -Algo	G	T	K	V	E	I	K	R							

FIG. 17 continuación