



No. 12-014021-00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:41:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI
CEA, HUMANIZADOS Y DE AFINIDAD MADURADA”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/30**

71. SOLICITANTE **ROCHE GLYCART AG**

DOMICILIO **SCHLIEREN, SUIZA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **30 ENE 2012**

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-014021- -00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:41:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **ROCHE GLYCART AG.**

Dirección: Wagistrasse 18, CH-8952
Schlieren, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Schlieren, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **HOFER, Thomas U.; HOSSE, Ralf; MOESSNER, Ekkehard y UMANA Pablo.**

Dirección: Buhnrain 8, CH-8052 Zuerich; Schmiedstrasse 8, CH-6330 Cham;
Felsenburgweg 5, CH-8280 Kreuzlingen y Felsenrainstrasse 28, CH-8832
Wollerau.

Nacionalidad o Domicilio: Suiza.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/062527

Fecha: 27/08/10

Publicación Internacional No. WO 2011/023787 A1

Fecha: 03/03/11

⑥

Título (54) **"ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI CEA, HUMANIZADOS Y DE AFINIDAD MADURADA"**

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/30

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

31/08/09

(31) Número de Solicitud

61/238,505

⑨

Comprobante de Pago No. 12,004,141

Fecha: 16 de Enero de 2012

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- ☒ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

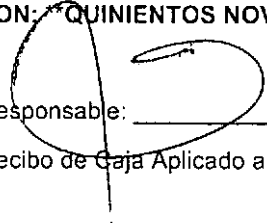
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 004141
		Bogotá D.C., Enero 16 de 2012 - 16:37:37

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.	NI 830.022.145
-----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	415004715	16/01/2012	47.015.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
			\$590.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-014021- -00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:41:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 257

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 16 de 2012 - 16:37:48

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2011-05-23-341
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Legalización

El suscrito, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea (Suiza), Dr. Christoph Nertz, por el presente legaliza la firma de Roche Glycart AG, una sociedad anónima con domicilio en Schlieren (Suiza), prestada por

El señor Antonio Natoli, ciudadano y residente en Basilea (Suiza), y La Señora Susanne Amann, ciudadana alemana, residente en Heitersheim (Alemania), ambos debidamente facultados para firmar documentos donde la propiedad de la sociedad es alienada.

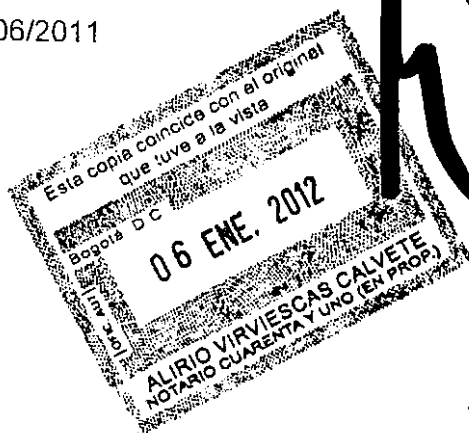
Personalmente conozco a los signatarios y las firmas.

Basilea (Suiza), este día 13 (trece) de abril de 2011 (dos mil once).

Sello.

BV 306/2011

(firma: ilegible)



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza
Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Público
4. y certificado por el sello del anterior nombrado

Certificado

5. en Basilea
6. el 14 de abril de 2011
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. No. 2473 / 5209
9. Sello/Estampilla
Sello de la Cancillería de Estado
de la Ciudad de Basilea
10. Firma: (ilegible)
Hanna Lauener



PRODUCTORA OFICIAL
01/07/89 MINJUSTICIA
[Signature]
ANITA L. DE TAMAYO

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

071152

Anda Escobar
COTA FIDUCIARIA PRECE EN EL
DOCUMENTO DE EMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2011 MAY 26 A 6:50

Jefe de LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original
que tuve a la vista
Bogotá D.C.
06 ENE. 2012
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

A

CERTIFICACION

expedida por el Registro Comercial del Cantón de Zurich

Por el presente certifico que la sociedad anterior está registrada en el Registro Comercial del Cantón de Zurich; una sociedad en comandita por acciones de nombre

Roche Glycart AG-----
(Roche Glycart Ltd)-----
domiciliada en Schlieren-----
Dirección: Wagistrasse 18, 8952 Schlieren-----

Esta sociedad ha sido registrada en el Registro Comercial del Cantón de Zurich el 18 de septiembre de 2000. Ha sido registrada en el registro mencionado bajo las siguientes versiones:

Del 18 de septiembre de 2000 – 21 de marzo de 2001

GlycArt Biotechnology GmbH-----
(GlycArt Biotechnology Ltd liab. Co)-----

Con registro en el diario no. 7749 el 21 de marzo de 2001, el siguiente registro fue publicado en la Gaceta Comercial Oficial de Suiza (SHAB), no. 60 el 27 de marzo de 2001:

Comentarios: En la asamblea de accionistas el 16.03.2001, se resolvió que el capital accionario se pagara completamente, que se podía aumentar en CHF 20,000.00 a CHF 100,000.00, y que GlycArt Biotechnology GmbH se transformara en una sociedad incluida en una lista pública. La Sociedad continuará comercializando sus activos y pasivos según la hoja del balance del 31.12.2000, sin haber sido liquidada.

Del 21 de marzo de 2001 – 20 de noviembre de 2003

(J1.LCC0: 288669.DOC v.1.1)



GlycArt Biotechnology AG-----
(GlycArt Biotechnology Ltd)-----

Del 20 de noviembre de 2003 – 23 de diciembre de 2009

GlycArt Biotechnology AG-----
(GlycArt Biotechnology Ltd)-----

Ha sido registrada el 23 de diciembre de 2009 bajo el siguiente nombre:

Roche Glycart AG-----
(Roche Glycart Ltd)-----

Además certifico que la sociedad mencionada está organizada de conformidad con las leyes de Suiza.

El Registro Comercial del Cantón de Zurich no puede ofrecer ninguna garantía en cuanto a la fidelidad de la traducción del texto original en alemán de este registro en el Registro Comercial.

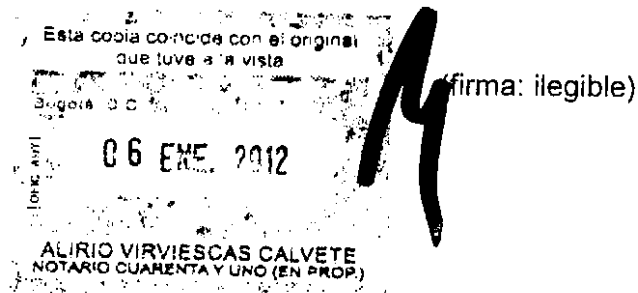
Zurich, Suiza, 28 de junio de 2010

Número de la sociedad: CH-020.4.333-11

Firmado: HI

Derechos: CHF 180.--

Sello



Basilea (Suiza), este día 13 (trece) de julio de 2010 (dos mil diez).

Oblea Notarial

(firma: ilegible)

BV 165/2010

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza
Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Público
4. y certificado por el sello del anterior nombrado

Certificado

- | | |
|--|-------------------------|
| 5. en Basilea | 6. el 4 de mayo de 2011 |
| 7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea | |
| 8. No. 2855 / 6082 | |
| 9. Sello/Estampilla | 10. Firma: (ilegible) |
| Sello de la Cancillería de Estado | Hanna Lauener |
| de la Ciudad de Basilea | |

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 24 de mayo de 2011, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.



(JLLCCO: 288669.DOC v.1)5

Anita Escobar de Tamayo

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

ADM. MAY 26/ A b: 50
071152
Anita Escobar
CUTAFUZA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Esta copia concorda con el original
que tuve a la vista
Bogotá D.C. 06 ENE. 2012
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

14

Los abajo firmados,

The undersigned,

Roche Glycart AG

Roche Glycart AG

con domicilio en

domiciled at

Wagistrasse 18
CH-8952 Schlieren (Suiza)

Wagistrasse 18
CH-8952 Schlieren (Switzerland)

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

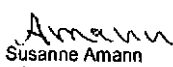
Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

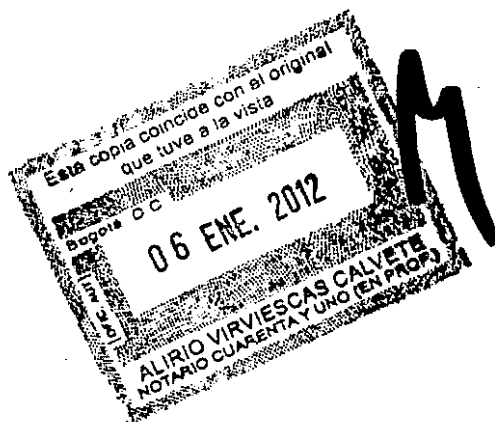
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Dado y firmado

Given and signed this 12th day of April 2011.

Roche Glycart AG


Antonio Natoli

Susanne Amann
authorized signatories



Legalization

The undersigned Notary Public of the Canton of Basel-Stadt (Switzerland), Dr. Christoph Nertz, herewith legalizes the overleaf signature

of **Roche Glycart AG**, a stock company with legal domicile in Schlieren (Switzerland), rendered by

Mister Antonio Natoli, citizen of and residing in Basel (Switzerland), and

Miss Susanne Amann, German citizen, residing in Heitersheim (Germany),

both duly entitled also to sign documents wherein property of the company is alienated.

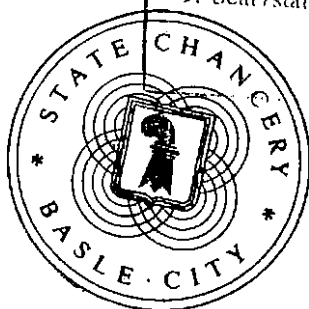
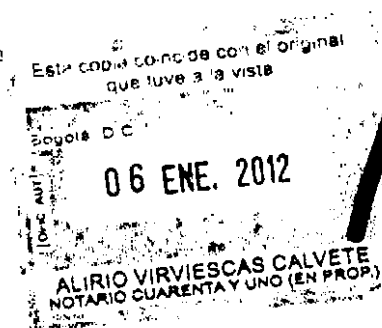
Signers and signatures personally known.

B a s e l (Switzerland), this 13th (thirteenth) day of April 2011 (two thousand and eleven).

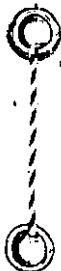


Dr. Christoph Nertz

BV 306/2011



APOSTILLE (Hague Convention of October 5 th , 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)	This official document
2. is signed by <i>Dr. Nertz</i>	
3. in his/her function as <i>notary public</i>	
4. and certified by the seal of the <i>above mentioned</i>	
5. in Basel (Bâle)	Certified
6. on <i>14. April 2011</i>	
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. no. <i>2473/5209</i>	
9. Seal / stamp:	10. Signature: <i>Hanna Lauener</i> Hanna Lauener



For true photocopy

HANDELSREGISTERAMT DES KANTONS ZÜRICH

CERTIFICATION

issued by the Commercial Registry of Canton Zurich

It is hereby certified that the following company is entered in the Commercial Register of Canton Zurich: a joint stock company by the name of

Roche Glycart AG-----
(Roche Glycart Ltd)-----

domiciled in Schlieren-----
Address: Wagistrasse 18, 8952 Schlieren-----

This company has been entered in the Commercial Register of Canton Zurich since 18th September 2000. It has been entered in the aforementioned register under the following versions:

From 18th September 2000 - 21st March 2001
GlycArt Biotechnology GmbH-----
(GlycArt Biotechnology Ltd liab. Co)-----

With journal entry no. 7749 of 21 March 2001, the following entry was published in the Official Commercial Gazette of Switzerland (SHAB), no. 60 of 27 March 2001:

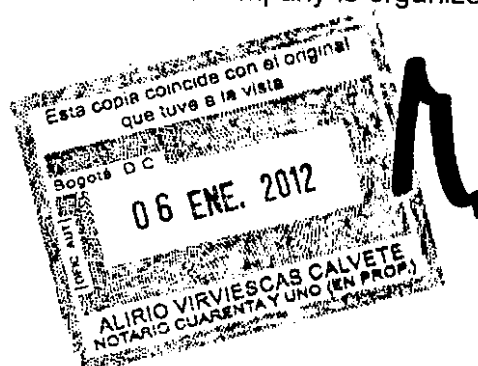
Remarks: At the shareholders' meeting on 16.03.2001, it was resolved that the share capital be fully paid up, that it be increased by CHF 20,000.00 to CHF 100,000.00, and that GlycArt Biotechnology GmbH be transformed into a publicly listed corporation. The Company will continue trading with all of its assets and liabilities as per the balance sheet of 31.12.2000, without being liquidated.

From 21st March 2001 - 20th November 2003
GlycArt Biotechnology AG-----
(GlycArt Biotechnology Ltd.)-----

From 20th November 2003 - 23rd December 2009
GlycArt Biotechnology AG-----
GlycArt Biotechnology Ltd)-----

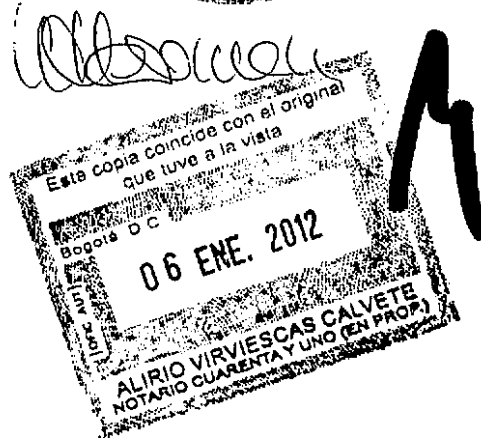
It has been entered since 23th December 2009 under the following name:
Roche Glycart AG-----
(Roche Glycart Ltd)-----

It is further certified that the aforementioned company is organized according to the laws of Switzerland.



The Commercial Registry Office of the Canton of Zurich can offer no guarantee as to the accuracy of the translation from the original German text of this entry in the Commercial Register.

Zurich, Switzerland, 28th June 2010
Company number: CH-020.4.022.333-1
Signed: HI
Fee: CHF 180.--



For true photocopy:

Basel (Switzerland), this 13th (thirteenth) day of July 2010 (two thousand and ten).

D. f. a. Schlager, Not

BV 165/2010

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *D. f. a. Schlager*

3. in his/her function as *notary public*

4. and certified by the seal of the

above mentioned

Certified

5. in Basel (Bâle)

6. on *4. Mai 2011*

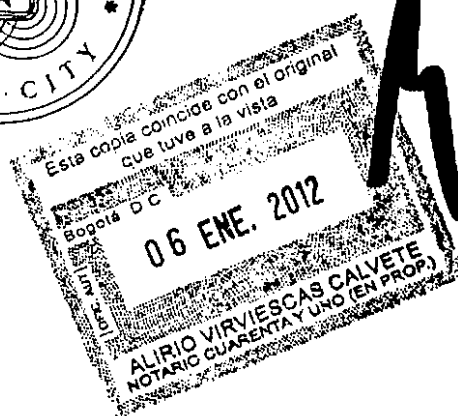
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. *28.55/6082*

9. Seal / stamp:

10. Signature:

H. Lauener
Hanna Lauener



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 30-01-12 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/238,505 31-08-09 US		(51) Int Cl: C07K 16/30 (71) Solicitante(s): ROCHE GLYCART AG. (72) Inventor(es): HOFER, Thomas U.; HOSSE, Ralf; MOESSNER, Ekkehard y UMANA Pablo. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 31-03-12 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-10 No. de solicitud: PCT/EP2010/062527		(87) Publicación internacional Fecha: 03-03-11 No. publicación: WO 2011/023787 A1	
(54) Título: "ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI CEA, HUMANIZADOS Y DE AFINIDAD MADURADA"			

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados o variantes de los mismos específicos para CEA humano de superficie celular o unido a membrana. Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos codificantes de dichas ABMs, y a vectores y células huésped que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos. La invención se refiere además a métodos para producir las ABMs de la invención, y a métodos de utilización de dichas ABMs en el tratamiento de enfermedades. Además, la presente invención se refiere a ABMs con glucosilación modificada que presentan propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con unión a receptor de Fc incrementada y función efectora incrementada.

Sector: anticuerpos monoclonales o policlonales de células tumorales.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) No. de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 30-01-12

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/30

(71) Solicitante(s): ROCHE GLYCART AG.

(72) Inventor(es): HOFER, Thomas U.; HOSSE, Ralf; MOESSNER, Ekkehard y UMANA Pablo.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

(32)

Fecha

(33)

País

61/238,505

31-08-09

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 31-03-12

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 03-03-11

Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-10

No. publicación: WO 2011/023787 A1

No. de solicitud: PCT/EP2010/062527

(54) Título: "ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI CEA, HUMANIZADOS Y DE AFINIDAD MADURADA"



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 30-01-12	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/30			
(71) Solicitante(s): ROCHE GLYCART AG.			
(72) Inventor(es): HOFER, Thomas U.; HOSSE, Ralf; MOESSNER, Ekkehard y UMANA Pablo.			
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/238,505	31-08-09	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 31-03-12		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 03-03-11	
Fecha de presentación de la solicitud: 27-08-10		No. Publicación : WO 2011/023787 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2010/062527			

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: "ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI CEA, HUMANIZADOS Y DE AFINIDAD MADURADA"

(57) Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados o variantes de los mismos específicos para CEA humano de superficie celular o unido a membrana. Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos codificantes de dichas ABMs, y a vectores y células huésped que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos. La invención se refiere además a métodos para producir las ABMs de la invención, y a métodos de utilización de dichas ABMs en el tratamiento de enfermedades. Además, la presente invención se refiere a ABMs con glucosilación modificada que presentan propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con unión a receptor de Fc incrementada y función efectora incrementada.

Sector: anticuerpos monoclonales o policlonales de células tumorales.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 26372 WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/062527	International filing date (day/month/year) 27/08/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 31/08/2009
Applicant ROCHE GLYCART AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

AFFINITY-MATURED HUMANIZED ANTI CEA MONOCLONAL ANTIBODIES

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/062527

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐

 on paper

☒

 In electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed

☐

 together with the international application in electronic form

☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/062527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/30

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CONAGHAN PJ ET AL: "Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanised IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen.", BRITISH JOURNAL OF CANCER 8 APR 2008 LNKD-PUBMED:18349843, vol. 98, no. 7, 8 April 2008 (2008-04-08), pages 1217-1225, XP002609357, ISSN: 0007-0920 page 1218, left-hand column - right-hand column page 1224, left-hand column	1-96
X	WO 95/06067 A1 (IMP CANCER RES TECH [GB]; BODMER WALTER FRED [GB]; DURBIN HELGA [GB];) 2 March 1995 (1995-03-02) page 5, line 8 - line 14; examples 6-8	1-96
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 2010

Date of mailing of the international search report

26/11/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, Kate11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/062527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG W-P ET AL: "CDR WALKING MUTAGENESIS FOR THE AFFINITY MATURATION OF A POTENT HUMAN ANTI-HIV-1 ANTIBODY INTO THE PICOMOLAR RANGE", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 254, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 392-403, XP000199739, ISSN: 0022-2836, DOI: DOI:10.1006/JMBI.1995.0626 * abstract	1-96
A	STEIDL S ET AL: "In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 46, no. 1, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 135-144, XP025472134, ISSN: 0161-5890, DOI: DOI:10.1016/J.MOLIMM.2008.07.013 [retrieved on 2008-08-21] * abstract	1-96
A	ZBAR A P ET AL: "Immune responses in advanced colorectal cancer following repeated intradermal vaccination with the anti-CEA murine monoclonal antibody, PR1A3: results of a phase I study.", INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE SEP 2005 LNKD- PUBMED:15864608, vol. 20, no. 5, September 2005 (2005-09), pages 403-414, XP002609358, ISSN: 0179-1958 the whole document	1-96
A	DURBIN H ET AL: "An epitope on carcinoembryonic antigen defined by the clinically relevant antibody PR1A3.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 10 MAY 1994 LNKD- PUBMED:7514303, vol. 91, no. 10, 10 May 1994 (1994-05-10), pages 4313-4317, XP002609359, ISSN: 0027-8424 * abstract ----- -/--	1-96

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/062527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM JIN C ET AL: "Enhancement of colorectal tumor targeting using a novel biparatopic monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen in experimental radioimmunoguided surgery.", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER 1 FEB 2002 LNKD-PUBMED:11802220, vol. 97, no. 4, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 542-547, XP002609360, ISSN: 0020-7136 * abstract	1-96
A	WO 2004/101790 A1 (DOMANTIS LTD [GB]; JESPER LAURENT S [GB]; JONES PHILIP C [GB]; FARM K) 25 November 2004 (2004-11-25) sequence 6	17
T	ASHRAF S Q ET AL: "Humanised IgG1 antibody variants targeting membrane-bound carcinoembryonic antigen by antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis.", BRITISH JOURNAL OF CANCER 17 NOV 2009 LNKD- PUBMED:19904275, vol. 101, no. 10, 17 November 2009 (2009-11-17), pages 1758-1768, XP002609361, ISSN: 1532-1827 * abstract	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 3 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/062527

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 97
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 97

Present claim 97 relates to "the invention as described hereinabove". Based upon the fact that no technical feature is defined in this claim, the claim is not fulfilling the requirements of Art. 6 PCT and does not define a scope that can be searched. As a consequence no search has been performed for claim 97.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/062527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9506067	A1	02-03-1995	AT 226596 T 15-11-2002
			AU 7390694 A 21-03-1995
			CA 2168440 A1 02-03-1995
			DE 69431602 D1 28-11-2002
			DE 69431602 T2 26-06-2003
			DK 721470 T3 24-02-2003
			EP 0721470 A1 17-07-1996
			ES 2187529 T3 16-06-2003
			JP 3492373 B2 03-02-2004
			JP 9501571 T 18-02-1997
			PT 721470 E 31-03-2003
			US 5965710 A 12-10-1999
WO 2004101790	A1	25-11-2004	AU 2004239065 A1 25-11-2004
			CA 2525120 A1 25-11-2004
			EP 1627062 A1 22-02-2006
			JP 2007535484 T 06-12-2007
			US 2009005257 A1 01-01-2009



(51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/062527

(22) International Filing Date:
27 August 2010 (27.08.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/238,505 31 August 2009 (31.08.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ROCHE GLYCART AG** [CH/CH]; Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **HOFER, Thomas** U. [CH/CH]; Buhrain 8, CH-8052 Zuerich (CH). **HOSSE, Ralf** [DE/CH]; Amuhelistrasse 20, CH-8906 Bonstetten (CH). **MOESSNER, Ekkehard** [DE/CH]; Felsenburgweg 5, CH-8280 Kreuzlingen (CH). **UMANA, Pablo** [CR/CH]; Fuhrstrasse 24a, CH-8820 Wädenswil (CH).

(74) Agent: **KLEIN, Thomas**; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: AFFINITY-MATURED HUMANIZED ANTI CEA MONOCLONAL ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention relates to antigen binding molecules (ABMs). In particular embodiments, the present invention relates to recombinant monoclonal antibodies, including chimeric, primatized or humanized antibodies or variants thereof specific for cell surface or membrane bound human CEA. In addition, the present invention relates to nucleic acid molecules encoding such ABMs, and vectors and host cells comprising such nucleic acid molecules. The invention further relates to methods for producing the ABMs of the invention, and to methods of using these ABMs in treatment of disease. In addition, the present invention relates to ABMs with modified glycosylation having improved therapeutic properties, including antibodies with increased Fc receptor binding and increased effector function.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 26372 WO	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2010/062527	International filing date (day/month/year) 27.08.2010	Priority date (day/month/year) 31.08.2009
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/30		
Applicant Roche Glycart AG		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand	Date of completion of this report	
21.06.2011	30.08.2011	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized officer Telephone No. +31 70 340-0	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/062527

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-72 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-216 as originally filed

Claims, Numbers

1-97 as originally filed

Drawings, Sheets

1/16-16/16 as originally filed

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/062527

5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:
- ☐ the entire international application,
 - ☒ claims Nos. 97
- because:
- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
 - ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 97
 - ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
 - ☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/062527

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>10, 12, 14, 15, 17-49, 55-59, 62, 63, 72-96</u>
	No: Claims	<u>1-9, 11, 13, 16, 50-54, 60, 61, 64-71</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-96</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-96</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the International application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item III

Present claim 97 relates to "the invention as described hereinabove". Based upon the fact that no technical feature is defined in this claim, the claim is not fulfilling the requirements of Art. 6 PCT and does not define a scope that can be searched. As a consequence no search has been performed for claim 97.

Re Item V

Reference is made to the following documents:

- D1 CONAGHAN PJ ET AL: "Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanised IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen.", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 98, no. 7, 8 April 2008, pages 1217-1225, XP002609357
- D2 WO 95/06067 A1 (IMP CANCER RES TECH [GB]; BODMER WALTER FRED [GB]; DURBIN HELGA [GB];) 2 March 1995
- D3 YANG W-P ET AL: "CDR Walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 254, 1 January 1995, pages 392-403, XP000199739,
- D4 STEIDL S ET AL: "In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification", MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 46, no. 1, 1 November 2008, pages 135-144, XP025472134
- D5 ZBAR A P ET AL: "Immune responses in advanced colorectal cancer following repeated intradermal vaccination with the anti-CEA murine monoclonal antibody, PR1A3: results of a phase I study.", INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE, vol. 20, no. 5, September 2005, pages 403-414, XP002609358
- D6 DURBIN H ET AL: "An epitope on carcinoembryonic antigen defined by the clinically relevant antibody PR1A3.", PNAS, vol. 91, no. 10, 10 May 1994, pages 4313-4317, XP002609359
- D7 KIM JIN C ET AL: "Enhancement of colorectal tumor targeting using a novel biparatopic monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen in experimental radioimmunoguided surgery.", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 97, no. 4, 1 February 2002, pages 542-547, XP002609360,

- D8 WO 2004/101790 A1 (DOMANTIS LTD [GB]; JESPERS LAURENT S [GB]; JONES PHILIP C [GB]; FAMM K) 25 November 2004
- D9 ASHRAF S Q ET AL: "Humanised IgG1 antibody variants targeting membrane-bound carcinoembryonic antigen by antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis.", BRITISH JOURNAL OF CANCER vol. 101, no. 10, 17 November 2009, pages 1758-1768, XP002609361

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because claims 1-9, 11, 13, 16, 50-54, 60, 61, 64-71 are not new in the sense of Article 33(2) PCT.

Document D1 discloses a humanized PR1A3 monoclonal antibody, binding only membrane-bound CEA and its cytotoxic effect in vitro (p.1218, left-hand column - right-hand-column, §1). Its use for therapy of colorectal cancer is suggested (abstract).

That the antibody is affinity - matured is not disclosed in D1. However this feature relates to the process for preparing the antibody but not to the antibody itself. Claims for products defined in terms of a process of manufacture are admissible only if the products as such fulfil the requirements for patentability, ie that they are new and inventive. In the present case this feature is the only distinguishing feature over the humanized antibody disclosed in D1. The antibody of claim 1 is therefore not rendered novel over D1 by the fact that it has been affinity - matured. The subject-matter of claim 1 is therefore not new over D1. The same applies for claims 2-9, 11, 13, 16, 50-54, 60, 61, 64-71.

The same objection is made based upon D2 which discloses a humanized anti CEA antibody having the CDRs of the murine PR1A3 mAb (sequences 28 and 30).

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because novel claims do not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

Document D2 is regarded as being the prior art closest to the subject-matter of claim 10, and discloses a humanized antibody of mouse mAb PR1A3 (example 6) having as CDRs, respectively for the heavy chain (see page 5, I.8-I.14) : VFGMN, and CDR2 and CDR3 of the present application having SEQ ID NO:15 and 25. For the light chain, CDR1 is KASQNVGTNVA (having one amino acid difference with SEQ ID NO: 38), CDR2 and CDR3 being as in the present application SEQ ID NO:55 and 56.

Claim 10 therefore differs from this humanized antibody in that the CDR1 of both the heavy and light chain variable regions are different. The claimed effect is an increased affinity. However because the link between the SEQ ID Numbers and the internal designations used in the examples and in tables 10 and 11 is not clear, it cannot be concluded that these sequences are associated with an increased affinity.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of an improved anti CEA humanized antibody. Without a clear indication that the claimed sequences are linked with an increased affinity the solution proposed in claim 10 of the present application cannot be considered to involve an inventive step (Article 33(3) PCT). Reconsideration of the inventive step may occur, should the link between the claimed sequences and the claimed effect be highlighted. The same reasoning applies for claims 15.

Claims 12 and 14 defining a partial solution to the problem posed do not solve it since the antibodies are structurally defined either by its light chain or its heavy chain variable regions. As a consequence the claims are not solving the problem posed and are not involving an inventive step.

The features of claims 17-49 do not appear to involve an inventive step, when combined with the ABM of any of the preceding claims, since they are either known to the skilled person (claims 16, 17, 32-44) or define the claims in terms of result to be achieved (18-23, 45-49), eventually combined with the technical features analysed just above (claims 24-31).

The same reasoning applies to claims 55-59, 62, 63 and 72-96. Claims lack also inventive step over D1, taken as closest prior art.

Re Item VIII

The present application contains 97 claims, of which 10 are independent. There is no clear distinction between the independent claims because of overlapping scope. There are so many claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, as it is particularly burdensome for a skilled person to establish the subject-matter for which protection is sought.

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI CEA, HUMANIZADOS Y DE AFINIDAD MADURADA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados o variantes de los mismos específicos para CEA humano de superficie celular o unido a membrana. Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos codificantes de dichas ABMs, y a vectores y células huésped que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos. La invención se refiere además a métodos para producir las ABMs de la invención, y a métodos de utilización de dichas ABMs en el tratamiento de enfermedades. Además, la presente invención se refiere a ABMs con glucosilación modificada que presentan propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con unión a receptor de Fc incrementada y función efectora incrementada.

SECTOR: anticuerpos monoclonales o policlonales de células tumorales.

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI CEA, HUMANIZADOS Y DE AFINIDAD MADURADA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

- [0001] La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para el antígeno carcinoembrionario humano (CEA). Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos codificantes de dichas ABMs, y a vectores y células huésped que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos. La invención se refiere además a métodos para producir las ABMs de la invención, y a métodos de utilización de dichas ABMs en el tratamiento de enfermedades. Además, la presente invención se refiere a ABMs con glucosilación modificada que presentan propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con unión incrementada a receptor de Fc y función efector incrementada, tal como ADCC.

Antecedentes de la técnica

Antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpos anti-CEA

- [0002] El antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CEACAM-5 o CD66e) es una glucoproteína que presenta un peso molecular de aproximadamente 180 kDa. CEA es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y contiene siete dominios que se encuentran unidos a la membrana celular mediante un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Thompson J.A., J. Clin. Lab. Anal. 5:344-366, 1991). Entre los siete dominios se incluyen un único dominio variable de Ig N-temrinal y seis dominios (A1-B1-A2-B2-A3-B3) homólogos al dominio constante de Ig (Hefta L.J. *et al.*, Cancer Res. 52:5647-5655, 1992).
- [0003] La familia del CEA humano contiene 29 genes, de los cuales 18 son expresados: 7 pertenecen al subgrupo de CEA y 11 al subgrupo de las glucoproteínas específicas del embarazo. Se cree que varios miembros del subgrupo de CEA presentan propiedades de adhesión celular. Se cree que CEA

presenta un papel en la inmunidad innata (Hammarström S., *Semin. Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999)). Debido a la existencia de proteínas estrechamente relacionadas a CEA, puede resultar difícil cultivar anticuerpos anti-CEA que sean específicos para CEA y que presenten una reactividad cruzada mínima con otras proteínas estrechamente relacionadas.

[0004] El CEA ha sido identificado desde hace mucho tiempo como un antígeno asociado a tumores (Gold y Freedman, *J. Exp. Med.* 121:439-462, 1965; Berinstein N.L., *J. Clin. Oncol.* 20:2197-2207, 2002). Aunque originalmente clasificado como una proteína que se expresaba únicamente en tejido fetal, ahora se ha identificado la presencia de CEA en varios tejidos adultos normales. Estos tejidos son principalmente de origen epitelial, incluyendo células de los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital, y células del colon, cérvix, glándulas sudoríparas y próstata (Nap *et al.*, *Tumour Biol.* 9(2-3):145-53, 1988; Nap *et al.*, *Cancer Res.* 52(8):2329-2339, 1992).

[0005] Los tumores de origen epitelial, así como sus metástasis, contienen CEA como antígeno asociado a tumor. Aunque la presencia misma de CEA no indica transformación en una célula cancerosa, la distribución de CEA es indicativa de la misma. En tejido normal, CEA se expresa generalmente sobre la superficie apical de la célula (Hammarström S., *Semin. Cancer Biol.* 9(2):67-81, 1999), provocando que resulte inaccesible para el anticuerpo presente en el flujo sanguíneo. En contraste con el tejido normal, CEA tiende a expresarse sobre la superficie completa de las células cancerosas (Hammarström S., *Semin. Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999)). Este cambio del patrón de expresión provoca que CEA resulte accesible para la unión de anticuerpo en las células cancerosas. Además, la expresión de CEA se incrementa en las células cancerosas. Además, la expresión incrementada de CEA estimula adhesiones intercelulares incrementadas, que pueden conducir a metástasis (Marshall J., *Semin. Oncol.* 30(a, supl. 8):30-6, 2003).

[0006] CEA resulta fácilmente cortado de la superficie celular, desprendiéndose al flujo sanguíneo desde los tumores, directamente o mediante los conductos linfáticos. Debido a dicha propiedad, el nivel de CEA en suero ha sido utilizado como marcador clínico para el diagnóstico de cánceres y el cribado para la recurrencia de los cánceres, particularmente el cáncer colorrectal (Goldenberg D.M., *The International Journal of Biological Markers* 7:183-188, 1992; Chau I. *et al.*, *J.*

Clin. Oncol. 22:1420-1429, 2004; Flamini *et al.*, Clin. Cancer Res. 12(23):6985-6988, 2006). Dicha propiedad también presenta uno de los retos de la utilización de CEA como diana, debido a que el CEA en suero se une a la mayoría de los anticuerpos anti-CEA disponibles actualmente, dificultando que estos alcancen su diana sobre la superficie celular y limitando sus efectos clínicos potenciales.

[0007] Se han cultivado múltiples anticuerpos monoclonales contra CEA con fines de investigación, como herramientas diagnósticas, y con fines terapéuticos (por ejemplo Nap *et al.*, Cancer Res. 52(8):2329-2339, 1992; Sheahan *et al.*, Am. J. Clin. Path. 94:157-164, 1990; Sakurai *et al.*, J. Surg. Oncol. 42:39-46, 1989; Goldenberg D.M., The International Journal of Biological Markers 7:183-188, 1992; Ledermann J.A., Br. J. Cancer 58:654, 1988; Ledermann J.A., Br. J. Cancer 68:69-73, 1993; Pedley R.B. *et al.*, Br. J. Cancer 68:69-73, 1993; Boxer G.M. *et al.*, Br. J. Cancer 65:825-831, 1992). Chester *et al.* han aislado un anticuerpo anti-CEA de una cadena a partir de una biblioteca de expresión fágica destinada a la utilización en radioinmunodetección y radioinmunoterapia (patente US nº 5.876.691) y el anticuerpo fue posteriormente humanizado (patente US nº 7.232.888). También se han aislado anticuerpos anti-CEA a partir de bibliotecas de expresión fágica humanas (patente US nº 5.872.215).

[0008] El anticuerpo monoclonal de ratón PR1A3 fue cultivado mediante la fusión de células de mieloma NS1 (P3/NS1/I-Ag-4-1) con células de bazo procedentes de ratones inmunizados con epitelio colorrectal normal (Richman P.I. y Bodmer W.F., Int. J. Cancer 39:317-328, 1987). PR1A3 reacciona fuertemente con carcinomas colorrectales tanto bien diferenciados como mal diferenciados y presenta ventajas respecto a los anticuerpos reactivos con el epitelio colorrectal debido a que su antígeno aparentemente se encuentra fijo al tumor y aparentemente no aparece en los conductos linfáticos ni en los nódulos linfáticos normales que drenan un tumor (Granowska M. *et al.*, Eur. J. Nucl. Med. 20:690-698, 1989). Por ejemplo, PR1A3 reaccionó con 59/60 tumores colorrectales (Richman P.I. y Bodmer W.F., Int. J. Cancer 39:317-328, 1987), mientras que el anticuerpo B72.3 reactivo con CEA reaccionó con únicamente 75% de los tumores colorrectales (Mansi L. *et al.*, Int. J. Rad. Appl. Instrum. B. 16(2):127-35, 1989).

[0009] El mapado de epítomos de PR1A3 muestra que la diana del anticuerpo es el dominio B3 y el anclaje GPI de la molécula de CEA (Durbin H. *et al.*, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 91:4313-4317, 1994). En consecuencia, el anticuerpo PR1A3 se une únicamente al CEA unido a membrana, y no a la forma soluble de CEA que puede encontrarse en el flujo sanguíneo de los pacientes de cáncer. Debido a dicha propiedad de unión, el anticuerpo PR1A3 probablemente no resultará secuestrado por el CEA sérico; por el contrario, puede presentar como diana el CEA expresado sobre células cancerosas. El epítipo que se une a PR1A3 es un epítipo conformacional, no un epítipo lineal, que se cree contribuye a la pérdida de unión de PR1A3 al CEA soluble (Stewart *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-06, 1999).

[0010] El anticuerpo PR1A3 fue humanizado anteriormente mediante injertación de las CDRs del anticuerpo parental murino con las regiones de marco 1 a 3 de cadena pesada del anticuerpo humano RF-TS3'CL (que conserva el marco murino 4 de PR1A3) y las regiones de marco de cadena ligera del anticuerpo REI (Stewart *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-06, 1999). Esta versión humanizada de PR1A3 conservaba especificidad, y para el CEA expresado en superficie, una afinidad similar a la del anticuerpo murino (Stewart *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-06, 1999; patente US nº 5.965.710). Se ha demostrado que un PR1A3 humanizado (PR1A3h) induce la eliminación dirigida de las líneas celulares de cáncer colorrectal (Conaghan P.J. *et al.*, Br. J. Cancer 98(7):1217-1225). Sin embargo, la afinidad de PR1A3h para CEA es relativamente baja.

[0011] Se han utilizado anticuerpos anti-CEA marcados radioactivamente en ensayos clínicos en pacientes que presentan cáncer colorrectal. Por ejemplo, se ha utilizando un minicuerpo quimérico T84.66 (cT84.66) marcado con ¹²³I en un estudio clínico piloto en pacientes que presentan cáncer colorrectal. El minicuerpo marcado radioactivamente era capaz de presentar como diana células cancerosas (Wong J.Y. *et al.*, Clin. Cancer Res. 10(15):5014-21, (2004)). En otro ejemplo, se sometió a ensayo I¹³³-labetuzumab, un anticuerpo anti-CEA humanizado marcado radioactivamente, en radioinmunoterapia con adyuvante en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal, y se encontró que proporcionaba una ventaja de supervivencia prometedora (Liersch T. *et al.*, Ann. Surg. Oncol. 14(9):2577-90, 2007).

Glucosilación de anticuerpos

- [0012] El componente oligosacárido puede afectar significativamente a propiedades relevantes a la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, la resistencia al ataque de proteasas, las interacciones con el sistema inmunológico, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no sólo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Pueden alcanzarse algunas generalizaciones sobre la relación entre estructura del oligosacárido y función de la glucoproteína. Por ejemplo, determinadas estructuras oligosacáridas median en la eliminación rápida de la glucoproteína del flujo sanguíneo mediante interacciones con proteínas de unión a carbohidrato específicas, mientras que otras pueden unirse a anticuerpos y desencadenar reacciones inmunológicas no deseadas (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996).
- [0013] Las células de mamífero han sido los huéspedes preferentes para la producción de glucoproteínas terapéuticas debido a su capacidad de glucosilar proteínas en la forma más compatible para la aplicación en el ser humano (Cumming *et al.*, *Glycobiology* 1:115-30, 1991; Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-981, 1996). Las bacterias muy raramente glucosilan las proteínas y, al igual que otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insecto y vegetales, proporcionan patrones de glucosilación asociados a la rápida eliminación del flujo sanguíneo, a interacciones inmunológicas no deseables y, en algunos casos específicos, a una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) han sido las utilizadas más comúnmente durante las últimas dos décadas. Además de proporcionar patrones de glucosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clonales altamente productivas genéticamente estables. Pueden cultivarse hasta densidades elevadas en biorreactores simples utilizando medios libres de suero, y permiten el desarrollo de procedimientos biológicos seguros y reproducibles. Entre otras células animales utilizadas comúnmente se incluyen las células renales de hámster neonato (BHK) y las células de mieloma de ratón NS0 y SP2/0. Más recientemente, también se ha

sometido a ensayo la producción a partir de animales transgénicos (Jenkins *et al.*, Nature Biotechnol. 14:975-81, 1996).

- [0014] Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de cadena pesada, presentando cada isotipo una serie diferente de estructuras de carbohidrato N-ligadas, que afectan variablemente al ensamblaje, secreción o actividad funcional de la proteína (Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997). La estructura del carbohidrato N-ligado unido varía considerablemente dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos ricos en manosa, de múltiples ramificaciones, así como oligosacáridos complejos biantenarios (Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997). Típicamente, se produce un procesamiento heterogéneo de las estructuras oligosacáridas nucleares unidas en un sitio de glucosilación particular, de manera que incluso los anticuerpos monoclonales existen en forma de una población de múltiples glucoformas. De manera similar, se ha demostrado que las diferencias principales en la glucosilación de los anticuerpos se producen entre líneas celulares, y que se observan incluso diferencias menores en una línea celular dada cultivada bajo condiciones de cultivo diferentes (Lifely M.R. *et al.*, Glycobiology 5(8):813-22, 1995).
- [0015] Una manera de obtener grandes incrementos de potencia, manteniendo simultáneamente un procedimiento de producción simple, y evitando potencialmente efectos secundarios no deseables significativos, es incrementar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como describen Umaña P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y la patente US nº 6.602.684, el contenido completo de la cual se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos utilizados más comúnmente en la inmunoterapia del cáncer, son glucoproteínas que presentan un sitio de glucosilación N-ligado conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos en Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia resulta esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely M.R. *et al.*, Glycobiology 5:813-822, 1995; Jefferis R. *et al.*, Immunol.

Rev. 163:59-76, 1998; Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotechnol. 15:26-32 (1997)).

[0016] Umaña *et al.* demostraron anteriormente que la sobreexpresión de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos biantenarios, en células de ovario de hámster chino (CHO) incrementa significativamente la actividad ADCC *in vitro* de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-neuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO manipuladas (ver Umaña P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y publicación de patente internacional nº WO 99/54342, el contenido completo de la cual se incorpora en la presente memoria como referencia). El anticuerpo chCE7 pertenece a una clase grande de mAbs no conjugados que presentan una afinidad y especificidad tumorales elevadas, pero que presentan demasiada poca potencial para resultar clínicamente útiles al producirse en líneas celulares industriales estándares que no presentan el enzima GnTIII (Umaña P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)). Dicho estudio fue el primero en demostrar que podían obtenerse grandes incrementos de actividad de ADCC mediante la manipulación de las células productoras de anticuerpos para que expresasen GnTIII, lo que también condujo a un incremento de la proporción de oligosacáridos biantenarios asociados a región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos no fucosilados biantenarios, por encima de los niveles observados en anticuerpos naturales.

[0017] Sigue existiendo una necesidad de enfoques terapéuticos mejorados con diana en CEA, en particular CEA unido a membrana, destinados al tratamiento de cánceres en primates, incluyendo, aunque sin limitación, el ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0018] Mediante el reconocimiento del tremendo potencial terapéutico de las moléculas de unión a antígeno (ABMs) que presentan la especificidad de unión del anticuerpo PR1A3 y de afinidad madurada y/o glucomanipuladas para incrementar la afinidad de unión a receptor de Fc y/o la función efectora, los presentes inventores han proporcionado dichas ABMs. En un aspecto, la invención se refiere a ABMs variantes y/o ABMS de afinidad madurada que son capaces de competir con el anticuerpo PR1A3 para la unión a un antígeno. La eficacia de dichas ABMS

se incrementa adicionalmente mediante la manipulación del perfil de glucosilación de la región Fc del anticuerpo.

- [0019] En un aspecto, la presente invención también se refiere a una molécula de unión a antígeno (ABM) que comprende un dominio de unión a antígeno humanizado de afinidad madurada que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en la que dicho dominio de unión a antígeno se une específicamente a antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana, y en la que dicho dominio de unión a antígeno se une al mismo epitopo que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3 o es capaz de competir con el mismo para la unión. La invención se refiere además a una ABM de la presente invención, presentando dicha ABM oligosacáridos modificados. En una realización, los oligosacáridos modificados presentan una fucosilación reducida en comparación con los oligosacáridos no modificados. En otras realizaciones, los oligosacáridos modificados son híbridos o complejos. En otro aspecto, la invención también se refiere a polipéptidos, polinucleótidos, células huésped y vectores de expresión relacionados con las ABMs. En un aspecto adicional, la invención se refiere a métodos de preparación de las ABMs. En un aspecto adicional, la invención se refiere a métodos de utilización de las ABMs, particularmente para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la expresión anormal del CEA, tal como cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- [0020] La FIGURA 1 muestra un diagrama esquemático del antígeno CEA (CEACAM-5, CD66e). El anticuerpo PR1A3 se une específicamente al dominio B3 del antígeno al encontrarse unido a la membrana celular.
- [0021] La FIGURA 2 muestra la actividad de ADCC incrementada de un anticuerpo PR1A3 quimérico glucomanipulado con PBMCs humanas como efectores.
- [0022] La FIGURA 3 muestra la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende un constructo de región variable de cadena pesada, CH7A, y un constructo de región variable de cadena ligera, CL1A.
- [0023] La FIGURA 4 muestra los sitios de aleatorización para generar una biblioteca de anticuerpos para la maduración de la afinidad de la cadena ligera del anticuerpo PR1A3 humanizado. Las posiciones marcadas con una X se aleatorizaron.

- [0024] La FIGURA 5 muestra sitios de aleatorización para generar una biblioteca de anticuerpos para la maduración de afinidad de la cadena pesada de anticuerpo PR1A3 humanizado. Las posiciones marcadas con una X se aleatorizaron.
- [0025] La FIGURA 6 muestra la actividad de unión de anticuerpos anti-CEA de afinidad madurada derivados de un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende un constructo de región variable de cadena pesada CH7ArF9 y un constructo de región variable de cadena ligera CL1ArH11.
- [0026] La FIGURA 7 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg que recibieron intraesplénicamente células de carcinoma colorrectal humano LS174T con el fin de disponer de un modelo tumoral ortotópico. Se inició la terapia de anticuerpos siete días después mediante la inyección de los anticuerpos a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal, seguido de dos inyecciones semanales adicionales. "CH7A" representa un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs de PR1A3 tal como se indica en la presente memoria. "SM3E" se refiere a un anticuerpo anti-CEA previamente generado. "GA201" representa un anticuerpo anti-EGF humanizado utilizado como control positivo. "PBS" se refiere a una solución salina tamponada con fosfato, que se utilizó como control negativo. Se midió la supervivencia según los criterios de terminación definidos por las autoridades reguladoras suizas.
- [0027] La FIGURA 8 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg que recibieron una inyección intravenosa de células de carcinoma pulmonar A549, en el que el tumor se injertó en el pulmón de los animales. Se inició la terapia de anticuerpos siete días después mediante la inyección de los anticuerpos a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal, seguido de dos inyecciones semanales adicionales. "CH7A", "SM3E" y "GA201" son tal como se indica en la figura 7, anteriormente. La denominación "CH7ArF9 CL1A rH11" representa una variante de anticuerpo CH7A con cadenas pesadas y ligeras de afinidad madurada. La denominación "ge" indica que el anticuerpo ha sido glucomanipulado para que presente un número reducido de oligosacáridos fucosilados en la región Fc. "Vehículo" se refiere al control negativo. Las células de carcinoma pulmonar A549 son fuertemente positivas para la expresión de EGFR y débilmente positiva para CEA.

- [0028] La FIGURA 9 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg que recibieron intraesplénicamente células de carcinoma gástrico MKN45, que genera metástasis tumoral en el hígado de los animales. Las denominaciones "CH7ArF9 CL1A rH11", "SM3E", "ge" y "PBS" son tales como las proporcionadas para las figuras 7 y 8, anteriormente.
- [0029] La FIGURA 10 muestra el análisis cinético de clones de afinidad madurada. (a) muestra un sensorgrama de Fabs anti-CEA con una cadena pesada de afinidad madurada CH7A H4E9 (SEC ID nº 199) conjuntamente con la cadena ligera no madurada CL1A (SEC ID nº 105), una cadena ligera de afinidad madurada CL1A pAC18 (SEC ID nº 209) en combinación con la cadena pesada no madurada CH7A, y una combinación de los mismos, CH7A H4E9 y CL1A pAC18 (SEC ID nº 199 y nº 209). (b) resumen del análisis cinéticos de los clones de afinidad madurada.
- [0030] La FIGURA 11 muestra una vista general esquemática de la aleatorización de CDR1 y CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-CEA CH7A humanizado.
- [0031] La FIGURA 12 muestra una vista general esquemática de la aleatorización de CDR1 y CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-CEA CL1A humanizado.
- [0032] La FIGURA 13 muestra una vista general esquemática de la aleatorización de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-CEA CH7A humanizado.
- [0033] La FIGURA 14 muestra una vista general esquemática de la aleatorización de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-CEA CL1A.
- [0034] La FIGURA 15 muestra la afinidad de unión de anticuerpos anti-CEA para CEA unido a membrana sobre células diana MKN45. Los anticuerpos anti-CEA humanizados con una cadena ligera de afinidad madurada (panel A, CH7A, CL1ArH7 o CH7A, CL1ArH11) o cadenas pesadas y ligeras de afinidad madurada (panel B, CH7A rB9, CL1ArH11 G2(1)) que han sido convertidas en IgG, muestran una unión mejorada en comparación con el anticuerpo de control (CH7A, CL1A).
- [0035] La FIGURA 16 muestra los resultados de un ensayo que analiza la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por parte de anticuerpos de afinidad madurada (CH7ArB9, CL1A rH11 G2(1), CH7 Arf9, CL1A rH11 G2(1) y CH7A, CL1A rH11 G2(1)) en comparación con anticuerpos de control (CH7A, CL1A G2(R2)).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

- [0036] Los términos se utilizan en la presente memoria tal como se utiliza de manera general en la técnica, a menos que se indique de otro modo de la manera siguiente.
- [0037] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Un ejemplo no limitativo de una molécula de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento del mismo que conserva la capacidad de unión específica a un antígeno. Más específicamente, tal como se utiliza en la presente memoria, una *molécula de unión a antígeno que se une al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana* es una ABM que se une específicamente a CEA, más particularmente a CEA de superficie celular o unido a membrana y no al CEA soluble cortado de la superficie celular. La expresión "de unión específica" se refiere a que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse respecto a interacciones no deseadas o no específicas.
- [0038] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término *anticuerpo* pretende incluir moléculas de anticuerpo completas, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (por ejemplo biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpo que presentan una región Fc y que conservan especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que conservan especificidad de unión. También se encuentran comprendidos los fragmentos de anticuerpos que conservan especificidad de unión, incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos de VH, fragmentos de VL, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos (ver, por ejemplo, Hudson y Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003)).
- [0039] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*dominio de unión a antígeno*" se refiere a la parte de la molécula de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte o a la totalidad de un antígeno. En el caso de que el antígeno sea de gran tamaño, una molécula de unión

a antígeno podría unirse únicamente a una parte particular del antígeno, parte que se denomina epítipo. Un dominio de unión a antígeno puede ser proporcionado por, por ejemplo, uno o más dominios variables de anticuerpo. Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

[0040] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*de afinidad madurada*" en el contexto de las moléculas de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos) se refiere a una molécula de unión a antígeno que se deriva de una molécula de unión a antígeno de referencia, por ejemplo mediante mutación, se une al mismo antígeno, preferentemente se une al mismo epítipo, que el anticuerpo de referencia, y que presenta una afinidad más alta para el antígeno que la de la molécula de unión a antígeno de referencia. La maduración de la afinidad generalmente implica la modificación de uno o más residuos aminoácidos en una o más CDRs de la molécula de unión a antígeno. Típicamente, la molécula de unión a antígeno de afinidad madurada se une al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno de referencia inicial.

[0041] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*afinidad de unión*" se expresa generalmente en términos de constantes de asociación o disociación en el equilibrio (K_a o K_d , respectivamente), que a su vez son proporciones recíprocas de constantes de tasa de disociación y asociación (k_d y k_a , respectivamente). De esta manera, las afinidad equivalentes pueden comprender diferentes constantes de tasa, con la condición de que la proporción entre las constantes de tasa no varíe.

[0042] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*región Fc*" se refiere a una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se encuentra definida en un segmento entre el residuo aminoácido en la posición Cys226 y el extremo carboxilo-terminal.

[0043] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina*" pretende incluir las variantes alélicas naturales de la región Fc de una inmunoglobulina, así como variantes que presentan alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones pero que no reducen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina de mediar en

funciones efectoras (tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos).

Por ejemplo, puede deleccionarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse según reglas generales conocidas de la técnica de manera que presenten un efecto mínimo sobre la actividad (ver, por ejemplo, Bowie J.U. *et al.*, Science 247:1306-10, 1990).

[0044] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*CEA humano unido a membrana*" se refiere a antígeno carcinoembrionario humano (CEA) que se encuentra unido a una parte de membrana de una célula o a la superficie de una célula, en particular a la superficie de una célula tumoral. La expresión "*CEA humano unido a membrana*" puede, en determinadas circunstancias, referirse a CEA que no se encuentra unido a la membrana de una célula, pero que ha sido construido de manera que conserve el epítipo al que se une el anticuerpo PR1A3. La expresión "*CEA soluble*" se refiere a antígeno carcinoembrionario humano que no se encuentra unido, o que resulta cortado, de una membrana celular o superficie celular (por ejemplo una superficie celular tumoral) y/o que, típicamente, no conserva el epítipo conformacional al que se une el anticuerpo PR1A3. El CEA soluble puede encontrarse, por ejemplo, en el flujo sanguíneo o en los conductos linfáticos de un sujeto que presenta cáncer.

[0045] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión *sin reactividad cruzada sustancial contra el CEA soluble* se refiere a que la molécula (por ejemplo una molécula de unión a antígeno) no reconoce o no se une específicamente a CEA soluble, particularmente en comparación con CEA unido a membrana. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno puede unirse a menos de entre aproximadamente 10% y menos de aproximadamente 5% de CEA soluble, o puede unirse a CEA soluble en una cantidad seleccionada de entre el grupo que consiste de menos de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% ó 0,1%, preferentemente menos de aproximadamente 2%, 1% ó 0,5% de CEA soluble, y más preferentemente menos de aproximadamente 0,2% ó 0,1% de CEA soluble.

[0046] Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*fusión*" y "*quimérico*", al utilizarse en referencia a polipéptidos tales como las ABMs, se refieren a polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de

dos o más polipéptidos heterólogos, tales como partes de anticuerpos procedentes de diferentes especies. Para las ABMs quiméricas, por ejemplo, los componentes que no se unen a antígeno pueden derivarse de una amplia diversidad de especies, incluyendo primates, tales como chimpancés y seres humanos. La región constante de la ABM quimérica es de manera general sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico generalmente comprende una secuencia que se deriva a partir de un anticuerpo anti-CEA recombinante que presenta la secuencia de aminoácidos de la región variable de PR1A3 murino. Los anticuerpos humanizados son una forma particularmente preferente de anticuerpo de fusión o quimérico.

[0047] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término *humanizado* se utiliza para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada en parte de una molécula de unión a antígeno no humano, por ejemplo un anticuerpo murino, que conserva, o que conserva sustancialmente, las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénico en el ser humano. Lo anterior puede conseguirse mediante diversos métodos (denominados en la presente memoria "*humanización*"), incluyendo, aunque sin limitación, (a) injertación de los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertación de únicamente las CDRs no humanas (por ejemplo una molécula de unión a antígeno de un donante) en regiones de marco y constantes humanas (por ejemplo una molécula de unión a antígeno receptora) con o sin conservación de residuos de marco críticos (por ejemplo aquellos que resultan importantes para conservar una buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "recubriéndolos" con una sección de tipo humano mediante sustitución de los residuos de superficie. Dichos métodos se dan a conocer en Jones *et al.*, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855, 1984; Morrison y Oi, Adv. Immunol. 44:65-92, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun. 28:489-498, 1991; Padlan, Molec. Immun. 31(3):169-217, 1994, la totalidad de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria. Existen de manera general 3 regiones determinantes de complementariedad, o CDRs, CDR1, CDR2 y CDR3, en cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo, que

se encuentran flanqueadas por cuatro subregiones de marco (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo. FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Puede encontrarse un comentario de los anticuerpos humanizados en, inter alia, la patente US nº 6.632.927 y en la solicitud publicada de patente US nº 2003/0175269, ambas incorporadas en la presente memoria como referencia en su totalidad. La humanización también puede conseguirse mediante el trasplante de CDRs truncadas que únicamente contienen los residuos aminoácidos determinantes de especificidad para la CDR dada en un marco seleccionado. La expresión "residuos determinantes de especificidad" se refiere a aquellos residuos que se encuentran directamente implicados en la interacción específica con el antígeno y/o que resultan necesarios para la unión específica a antígeno. En general, sólo aproximadamente un quinto a un tercio de los residuos en una CDR dada participan en la unión a antígeno. Los residuos determinantes de especificidad en una CDR particular pueden identificarse mediante, por ejemplo, el cálculo de los contactos interatómicos a partir de modelado tridimensional y la determinación de la variabilidad de secuencias en una posición de residuo dada según los métodos descritos en Padlan *et al.*, FASEB J. 9(1):133-139, 1995, el contenido de la cual se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria.

[0048] En algunos casos, los residuos de región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, las moléculas de unión a antígeno humanizadas pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento de la molécula de unión a antígeno. En general, la molécula de unión a antígeno humanizada comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos un dominio variable, y típicamente dos, en los que por lo menos una, o sustancialmente la totalidad, o la totalidad, de las regiones hipervariables, corresponde a las de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las FRs son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. La molécula de unión a antígeno humanizada opcionalmente también comprende por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986;

Reichmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992).

- [0049] De manera similar, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "*primatizado*" se utiliza para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada de una molécula de unión a antígeno no de primate, por ejemplo un anticuerpo murino, que conserva, o que conserva sustancialmente, las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénica en primates.
- [0050] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "*variante*" (o *análogo*) referido a un polinucleótido o polipéptido se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido específicamente indicado de la invención, mediante inserciones, deleciones y sustituciones, creadas utilizando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante. Específicamente, las variantes recombinantes codificantes dichos mismos polipéptidos o polipéptidos similares pueden sintetizarse o seleccionarse utilizando la "redundancia" del código genético. Pueden introducirse diversas sustituciones de codones, tales como cambios silenciosos que producen diversos sitios de restricción, para optimizar la clonación en un vector plásmido o vírico o de expresión en un sistema procariótico o eucariótico particular. Las mutaciones en la secuencia polinucleótida pueden reflejarse en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de una parte cualquiera del polipéptido, para modificar características tales como las afinidades de unión a ligando, las afinidades entre cadenas o la tasa de degradación/renovación.
- [0051] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*molécula de unión a antígeno anti-CEA variante*" se refiere a una molécula que difiere en secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de una molécula de unión a antígeno anti-CEA "parental" en virtud de la adición, deleción y/o sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la secuencia de anticuerpos parental. En una realización específica, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables o CDRs de la cadena pesada y/o ligera de la molécula parental de unión a antígeno. Por ejemplo, la variante puede comprender por lo menos una, por ejemplo entre aproximadamente una y aproximadamente diez (es decir, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10) y preferentemente entre aproximadamente dos y aproximadamente 5 sustituciones en

una o más regiones hipervariables o CDRs (es decir, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 regiones hipervariables o CDRs) de la molécula parental de unión a antígeno. Una molécula de unión a antígeno anti-CEA variante también puede comprender una o más adiciones, deleciones y/o sustituciones en una o más regiones marco de la cadena pesada o de la cadena ligera. Habitualmente, la variante presenta una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% respecto a las secuencias de dominio variable de cadena pesada o ligera de la molécula parental de unión a antígeno, típicamente por lo menos aproximadamente 80%, 90%, 95% ó 99%. La identidad con respecto a una secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que resulta idéntico a los residuos del anticuerpo parental, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencias. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo debe interpretarse que afecta a la identidad o a la homología de secuencia. La molécula de unión a antígeno variante conserva la capacidad de unirse a CEA humano unido a membrana, por ejemplo se une al mismo epítipo que la molécula parental de unión a antígeno, y preferentemente presenta propiedades que son superiores a las de la molécula parental de unión a antígeno. Por ejemplo, la variante puede presentar una afinidad de unión más fuerte, una capacidad incrementada de inducir citotoxicidad celular mediada por anticuerpos *in vitro* e *in vivo*. Para analizar dichas propiedades, generalmente debe compararse una molécula variante de unión a antígeno y la molécula parental de unión a antígeno en el mismo formato, por ejemplo una forma Fab de la molécula variante de unión a antígeno con una forma Fab de la molécula parental de unión a antígeno o una forma de longitud completa de la molécula variante de unión a antígeno con una forma de longitud completa de la molécula parental de unión a antígeno. La molécula variante de unión a antígeno de interés particular en la presente memoria es una que presenta por lo menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces ó 20 veces más actividad biológica que la molécula parental de unión a antígeno.

[0052] El término "*parental*" referido a la molécula de unión a antígeno se refiere a una ABM que se utiliza como punto de partida o base para la preparación de la variante. En una realización específica, la molécula parental de unión a antígeno presenta una región marco humana y, en caso de encontrarse presente, una o más regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

[0053] Las "*sustituciones*" de aminoácidos pueden resultar en la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que presente propiedades estructurales y/o químicas similares, por ejemplo sustituciones de aminoácidos conservadoras. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos "*conservadoras*" basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, entre los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) se incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; entre los aminoácidos neutros polares se incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; entre los aminoácidos de carga positiva (básicos) se incluyen arginina, lisina e histidina; y entre los aminoácidos de carga negativa (ácidos) se incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las "*inserciones*" o "*deleciones*" generalmente se refieren a entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 aminoácidos, más específicamente a entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 aminoácidos, y todavía más específicamente a entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 aminoácidos. Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un miembro de una de dichas clases por un miembro de otra clase. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos también puede resultar en la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que presente propiedades estructurales y/o químicas diferentes, por ejemplo la sustitución de un aminoácido de un grupo (por ejemplo polar) por otro aminoácido de un grupo diferente (por ejemplo básico). La variación permitida puede determinarse experimentalmente mediante la realización sistemática de inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en una molécula de polipéptido utilizando técnicas de ADN recombinante y sometiendo a ensayo las variantes recombinantes resultantes para la actividad.

[0054] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*Fv de una cadena*", o "*scFv*", se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH y

un dominio VL como cadena polipeptídica única. Típicamente, los dominios VH y VL se unen mediante una secuencia linker (ver, por ejemplo, Pluckthun, en: THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore, editores. Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994).

- [0055] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "minicuerpo" se refiere a un derivado scFv homodimérico bivalente que contiene una región constante, típicamente la región CH3 de una inmunoglobulina, preferentemente IgG, más preferentemente IgG1, como la región de dimerización. Generalmente, la región constante se conecta a scFv mediante una región bisagra y/o una región linker. Pueden encontrarse ejemplos de proteínas minicuerpos en Hu *et al.* Cancer Res. 56: 3055-61, 1996.
- [0056] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "diacuerpo" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un linker que es excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el apareamiento de los dominios con los dominios complementarios de otra cadena y la creación de dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, las patentes EP nº 404.097 y WO nº 93/11161, y en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993. Un *triacuerpo* resulta de la formación de un trímero trivalente de tres scFvs, rindiendo tres sitios de unión, y un *tetracuerpo* es un tetrámero tetravalente de cuatro scFvs, que resulta en cuatro sitios de unión.
- [0057] En el caso de que existan dos o más deficiencias de una expresión que se utilice y/o se encuentre aceptada en la técnica, la definición del término utilizada en la presente memoria pretenderá incluir la totalidad de dichos significados, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es la utilización de la expresión "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describe los sitios de unión a antígeno no contiguos (también conocidos como regiones de unión a antígeno) presentes dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. Las CDRs también se denominan "regiones hipervariables" y esta expresión se utiliza intercambiamente en la presente

invención con el término "CDR" en referencia a partes de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1983, y por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987, que se incorporan en la presente memoria como referencia, en donde las definiciones incluyen residuos aminoácidos solapantes o subconjuntos de residuos aminoácidos al compararlos entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de la misma pretende encontrarse comprendida dentro del alcance de la expresión según se define y se utiliza en la presente memoria. Los residuos aminoácidos apropiados que comprenden las CDRs tal como se definen en cada una de las referencias citadas se proporcionan a continuación, en la Tabla 1, a modo comparativo. El número exacto de residuos que comprende una CDR particular varía dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. El experto en la materia podrá determinar rutinariamente qué residuos comprende una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

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

¹La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 sigue las convenciones de numeración proporcionadas por Kabat *et al.* (ver posteriormente).

²"AbM" con una "b" minúscula, tal como se utiliza en la Tabla 1, se refiere a las CDRs según la definición del programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

[0058] Kabat *et al.* también han definido un sistema de numeración para las secuencias de dominio variable que resulta aplicable a cualquier anticuerpo. El experto ordinario en la materia podrá asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable sin basarse en ningún dato experimental más allá de la secuencia misma. Tal como se utiliza en la

presente memoria, la expresión "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración proporcionado por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1983. A menos que se indique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos aminoácidos en una ABM se proporcionan según el sistema de numeración de Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (es decir, SEC ID nº 1 a SEC ID nº 216) no han sido numeradas según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, al experto ordinario en la materia le resultará familiar cómo convertir las secuencias en el listado de secuencias a la numeración de Kabat.

[0059] Un ácido nucleico o polinucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención pretende referirse a que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleótida puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos por lo menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden deleccionarse o sustituirse por otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia.

[0060] En la práctica, puede determinarse convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos si cualquier molécula de ácidos nucleicos o polipéptido particular es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos o secuencia polipeptídica de la presente invención. Un método para determinar la correspondencia global óptima entre una secuencia-pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominado alineación de secuencias global, puede determinarse utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990. En una alineación de secuencias, las secuencias pregunta y sujeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede compararse mediante la conversión de Us en Ts. El resultado de dicha alineación global de secuencias se expresa en porcentaje de identidad. Los parámetros

preferentes utilizados en una alineación de FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuplo=4, penalización por desapareamiento=1, penalización de unión=30, longitud de grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, penalización por hueco=5, penalización de tamaño de hueco=0,05, tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia sujeto de nucleótidos, la que sea más corta.

[0061] En el caso de que la secuencia sujeto sea más corta que la secuencia-pregunta debido a deleciones 5' ó 3', no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Lo anterior se debe a que el programa FASTDB no considera las truncaciones 5' y 3' de la secuencia sujeto al calcular el porcentaje de identidad. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos 5' ó 3', respecto a la secuencia-pregunta, el porcentaje de identidad se corrige mediante el cálculo del número de bases de la secuencia-pregunta situado 5' y 3' respecto a la secuencia sujeto que no se encuentran apareadas/alineadas, como porcentaje del total de bases de la secuencia-pregunta. El apareamiento/alineación de un nucleótido se determina a partir de los resultados de la alineación de secuencias de FASTDB. A continuación, dicho porcentaje se resta del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, alcanzando una puntuación final de porcentaje de identidad. Esta puntuación corregida se utiliza para los fines de la presente invención. Únicamente las bases en el exterior de las bases 5' y 3' respecto a la secuencia sujeto, visualizadas utilizando la alineación de FASTDB, que no se encuentran apareadas/alineadas con la secuencia-pregunta, son calculadas a fin de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad.

[0062] Por ejemplo, se alinea una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia-pregunta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las deleciones se producen en el extremo 5' de la secuencia sujeto y, por lo tanto, la alineación de FASTDB no muestra un apareamiento/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no apareadas representan 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no apareadas/número total de bases en la secuencia-pregunta), de manera que se resta 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. En el caso de que las 90 bases restantes se encontrasen perfectamente apareadas, el porcentaje final de identidad

sería de 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia-pregunta de 100 bases. En este caso las deleciones son internas, de manera que no existen bases en el lado 5' ó 3' de la secuencia sujeto que no se encuentren apareadas/alineadas con la secuencia-pregunta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Nuevamente, únicamente las bases 5' y 3' respecto a la secuencia sujeto que no se encuentran apareadas/alineadas con la secuencia-pregunta se corrigen manualmente. No resulta necesario realizar ninguna otra corrección manual para los fines de la presente invención.

[0063] Un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia-pregunta de aminoácidos de la presente invención, pretende referirse a que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sujeto es idéntica a la secuencia-pregunta, excepto en que la secuencia del polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia-pregunta de aminoácidos. En otras palabras, para obtener un polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a una secuencia-pregunta de aminoácidos, hasta 5% de los residuos aminoácidos en la secuencia sujeto pueden insertarse, deleccionarse o sustituirse por otro aminoácido. Dichas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino-terminal o carboxi-terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia, o en cualquier posición entre dichas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

[0064] En la práctica, puede determinarse convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos si cualquier polipéptido particular es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia. Un método para determinar la correspondencia global óptima entre una secuencia-pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominado alineación de secuencias global, puede determinarse utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990. En una alineación de secuencias, las secuencias-pregunta y sujeto son ambas secuencias de nucleótidos o ambas son

secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación global de secuencias se expresa en porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en una alineación de aminoácidos de FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuplo=2, penalización por desapareamiento=1, penalización de unión=20, longitud de grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, tamaño de ventana=longitud de la secuencia, penalización por hueco=5, penalización de tamaño de hueco=0,05, tamaño de ventana=500 ó la longitud de la secuencia sujeto de aminoácidos, la que sea más corta.

[0065] En el caso de que la secuencia sujeto sea más corta que la secuencia-pregunta debido a deleciones N-terminales o C-terminales, no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Lo anterior se debe a que el programa FASTDB no considera las truncaciones N-terminales y C-terminales de la secuencia sujeto durante el cálculo del porcentaje global de identidad. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos N-terminal y C-terminal, respecto a la secuencia-pregunta, el porcentaje de identidad se corrige mediante el cálculo del número de residuos de la secuencia-pregunta N-terminales y C-terminales respecto a la secuencia sujeto que no se encuentran apareados/alineados con un residuo correspondiente de la secuencia sujeto, en forma de porcentaje del total de bases de la secuencia-pregunta. Si un residuo se encuentra apareado/alineado se determina a partir de los resultados de la alineación de secuencias de FASTDB. A continuación, dicho porcentaje se resta del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, alcanzando una puntuación final de porcentaje de identidad. Dicha puntuación final de porcentaje de identidad es la utilizada para los fines de la presente invención. Únicamente los residuos de los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia sujeto que no se encuentran apareados/alineados con la secuencia-pregunta se consideran para los fines de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad. Es decir, únicamente las posiciones de residuos en la cadena-pregunta más allá de los residuos N-terminales y C-terminales de la secuencia sujeto más alejados.

[0066] Por ejemplo, se alinea una secuencia sujeto de 90 residuos aminoácidos con una secuencia-pregunta de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo N-terminal de la secuencia sujeto y, por lo

tanto, la alineación de FASTDB no muestra un apareamiento/alineación de los primeros 10 residuos del extremo N-terminal. Los 10 residuos no apareados representan 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos N-terminal y C-terminal no apareado/número total de residuos en la secuencia-pregunta), de manera que se resta 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. En el caso de que los 90 residuos restantes se encontrasen perfectamente apareados, el porcentaje final de identidad sería de 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 residuos con una secuencia-pregunta de 100 residuos. En este caso, las deleciones son deleciones internas, de manera que no existen residuos en los extremos N-terminal o C-terminal de la secuencia sujeto que no se encuentren apareados/alineados con la secuencia-pregunta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Nuevamente, únicamente las posiciones de residuos más allá de los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia sujeto, visualizadas en la alineación de FASTDB, que no se encuentran apareadas/alineadas con la secuencia-pregunta se corrigen manualmente. No resulta necesario realizar otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

- [0067] El porcentaje de identidad de polinucleótidos y/o polipéptidos también puede determinarse utilizando los programas BLAST disponibles del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando los parámetros por defecto indicados en los programas.
- [0068] Tal como se utiliza en la presente memoria, un ácido nucleico que "se hibrida bajo condiciones astringentes" a una secuencia de ácidos nucleicos de la invención se refiere a un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones especificadas, por ejemplo en una incubación durante la noche a 42°C en una solución que comprende formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, dextrán sulfato al 10% y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado), seguido del lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65°C.
- [0069] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*polipéptido que presenta actividad de GnTIII*" se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo N-acetilglucosamina (GlcNAc) en enlace β-1-4 al manósido β-ligado del núcleo trimanosilo de oligosacáridos N-ligados. Lo anterior incluye

polipéptidos que muestran una actividad enzimática similar, aunque no necesariamente idéntica, a una actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glucoproteína-4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.4.1.144) según el comité de nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), según medición en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de las dosis. En el caso de que exista dependencia de dosis, no necesariamente es idéntica a la de GnTIII, aunque es sustancialmente similar a la dependencia de dosis en una actividad dada en comparación con GnTIII (es decir, el polipéptido candidato mostrará una actividad mayor o no más de aproximadamente 25 veces inferior y, preferentemente, no más de aproximadamente diez veces inferior, y más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces inferior en comparación con GnTIII).

- [0070] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*dominio de localización en Golgi*" se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en el Golgi que es responsable de anclar el polipéptido a una localización dentro del complejo de Golgi. Generalmente, los dominios de localización comprenden "colas" amino-terminales de un enzima.
- [0071] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*función efectora*" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia variante de aminoácidos) de un anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitación, la afinidad de unión de receptor de Fc, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), la secreción de citoquinas, la incorporación de antígenos mediada por complejo inmunológico por parte de células presentadoras de antígenos, la regulación negativa de receptores de superficie celular, etc.
- [0072] Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*manipular, manipulado, manipulación*", particularmente con el prefijo "*gluco*", así como la expresión "*manipulación por glucosilación*" se considera que incluyen cualquier manipulación del patrón de glucosilación de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La manipulación por glucosilación incluye la manipulación metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacáridos para conseguir

una glucosilación alterada de las glucoproteínas expresadas en las células. Además, la manipulación por glucosilación incluye los efectos de mutaciones y el ambiente celular sobre la glucosilación. En una realización, la manipulación por glucosilación es una alteración de la actividad de glucosiltransferasa. En una realización particular, la manipulación resulta en una actividad de glucosaminiltransferasa y/o de fucosiltransferasa alteradas.

[0073] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*célula huésped*" comprende cualquier tipo de sistema celular que pueda manipularse para generar los polipéptidos y moléculas de unión a antígeno de la presente invención. En una realización, la célula huésped se manipula para permitir la producción de una molécula de unión a antígeno con glucoformas modificadas. En una realización preferente, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión. En determinadas realizaciones, las células huésped han sido manipuladas adicionalmente para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que presentan actividad de GnTIII. Entre las células huésped se incluyen células en cultivo, por ejemplo células de mamífero en cultivo, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, entre otras, aunque también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal en cultivo.

[0074] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*citotoxicidad celular mediada por Fc*" incluye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión de Fc soluble que contiene una región Fc humana. Es un mecanismo inmunológico que conduce a la lisis de "células diana" por parte de "células efectoras inmunológicas humanas".

[0075] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*células efectoras inmunológicas humanas*" se refiere a una población de leucocitos que expresan receptores de Fc sobre sus superficies, a través de las que se unen a la región Fc de moléculas de unión a antígeno o de proteínas de fusión de Fc y llevan a cabo funciones efectoras. Dicha población puede incluir, aunque sin limitación, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células asesinas naturales (NK).

[0076] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*células diana*" se refiere a células a las que se unen específicamente moléculas de unión a antígeno que comprenden una región Fc (por ejemplo anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una región Fc) o proteínas de fusión de Fc. Las moléculas de unión a antígeno o proteínas de fusión de Fc se unen a las células diana mediante la parte de la proteína que es N-terminal respecto a la región Fc.

[0077] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada*" se define como un incremento del número de "células diana" que resultan lisadas en un tiempo dado, a una concentración dada de moléculas de unión a antígenos o de proteínas de fusión de Fc en el medio circundante a las células diana, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc definido anteriormente, y/o mediante una reducción de la concentración de moléculas de unión a antígeno o de proteínas de fusión de Fc, en el medio circundante a las células diana, necesaria para conseguir la lisis de un número dado de "células diana", en un tiempo dado, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc. El incremento de citotoxicidad celular mediada por Fc se refiere a la citotoxicidad celular mediada por la misma molécula de unión a antígeno o proteína de fusión de Fc producida por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos estándares de producción, purificación, formulación y almacenamiento (que son conocidos del experto en la materia) pero que no ha sido producido por células huésped manipuladas para que presenten un patrón alterado de glucosilación (por ejemplo para expresar la glucosiltransferasa, GnTIII, u otras glucosiltransferasas) mediante los métodos descritos en la presente memoria.

[0078] La expresión "*molécula de unión a antígeno que presenta citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada*" se refiere a una molécula de unión a antígeno, tal como se define esta expresión en la presente memoria, que presenta una ADCC incrementada según determinación mediante cualquier método adecuado conocido por el experto ordinario en la materia. Un ensayo ADCC *in vitro* aceptado es el siguiente:

- 1) el ensayo utiliza células diana que es conocido que expresan el antígeno diana reconocido por la región de unión a antígeno del anticuerpo,

2) el ensayo utilizan células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), aisladas de sangre de un donante sano seleccionado aleatoriamente, como células efectoras,

3) el ensayo se lleva a cabo siguiendo el protocolo siguiente:

i) las PBMCs se aíslan utilizando procedimientos estándares de centrifugación en gradiente de densidad y se suspenden a una densidad de 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI,

ii) las células diana se cultivan mediante métodos estándares de cultivo de tejidos, se recolectan de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior a 90%, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 microCuries de ^{51}Cr , se lavan dos veces con medio de cultivo celular y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml,

iii) se transfieren 100 microlitros de la suspensión celular diana final a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos,

iv) el anticuerpo se diluye en serie entre 4.000 ng/ml y 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa de microtitulación de 96 pocillos, sometiendo a ensayo por triplicado diversas concentraciones de anticuerpo que cubren el intervalo de concentraciones completo indicado anteriormente,

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales en la placa que contenía las células diana marcadas recibieron 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (v/v) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis) en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv, anteriormente),

vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pocillos adicionales en la placa que contenía las células diana marcadas recibieron 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv, anteriormente),

vii) a continuación, la placa de microtitulación de 96 pocillos se centrifugó a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incubó durante 1 hora a 4°C ,

viii) se añadieron 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i, anteriormente) a cada pocillo, rindiendo una proporción de efector:célula diana de 25:1, y las placas se introdujeron en un incubador bajo una atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C durante 4 horas,

ix) el sobrenadante libre de células de cada pocillo se recolectó y la radioactividad (ER) liberada experimentalmente se cuantificó utilizando un contador gamma,

x) se calculó el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo según la fórmula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, en la que ER es la radioactividad cuantificada media (ver punto ix, anteriormente) para dicha concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad cuantificada media (ver punto ix, anteriormente) para los controles MR (ver punto v, anteriormente) y SR es la radioactividad cuantificada media (ver punto ix, anteriormente) para los controles SR (ver punto vi, anteriormente),

4) se define "ADCC incrementada" como un incremento del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a ensayo anteriormente, y/o una reducción de la concentración de anticuerpo necesaria para conseguir la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observado dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a ensayo anteriormente. El incremento de ADCC es respecto a la ADCC, medida con el ensayo anteriormente indicado, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos estándares de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son conocidos por el experto en la materia, pero que no ha sido producido por células huésped manipuladas para sobreexpresar GnTIII.

Moléculas de unión a antígeno anti-CEA

[0079] CEA ha sido utilizado desde hace mucho tiempo como marcador del cáncer con fines diagnósticos. Se expresa anormalmente (por ejemplo se sobreexpresa y/o se distribuye en un patrón diferente en la célula) en muchos tejidos tumorales en comparación con tejidos no tumorales del mismo tipo celular. Sin embargo, debido a que CEA generalmente se escinde de la superficie de la célula tumoral y la mayor parte de los anticuerpos anti-CEA disponibles también se unen al CEA soluble, los anticuerpos no conjugados con CEA generalmente no se utilizan con fines terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CEA que se encuentran actualmente

en ensayos piloto se administran en forma de radioconjugados (Wong *et al.*, 2004; Liersch *et al.*, 2007).

[0080] Se encuentran implicados varios mecanismos en la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-CEA, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La expresión incrementada de CEA induce una adhesión intercelular incrementada, que puede conducir a la metástasis de las células cancerosas (Marshall J., Semin. Oncol. 30(3) supl. 8:30-36). De esta manera, las moléculas de unión a antígeno anti-CEA también podrían desempeñar un papel en la inhibición de la adhesión celular mediada por CEA y en la metástasis de las células cancerosas.

[0081] En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno (por ejemplo un anticuerpo o fragmento del mismo) que comprende una o más (por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDRs del anticuerpo PR1A3 murino, en el que por lo menos una de las CDRs presenta la sustitución de por lo menos un residuo aminoácido en comparación con la CDR correspondiente de PR1A3, y en el que la molécula de unión a antígeno presenta una afinidad mejorada para CEA, preferentemente CEA unido a membrana, en comparación con una molécula parental de unión a antígeno PR1A3. Dicho CDR o CDRs pueden ser CDRs truncados y contener, como mínimo, los residuos determinantes de especificidad (SDRs), tal como se define esta expresión en la presente memoria, para una CDR dada. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende por lo menos una (por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDRs proporcionadas en la Tabla 2, proporcionada posteriormente, que comprende los residuos de las CDRs que conservan la especificidad de unión. En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende por lo menos una (por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDRs proporcionadas en la Tabla 2, posteriormente, o una variante o forma truncada de las mismas que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad de dicha CDR, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización específica, en la que la molécula de unión a antígeno comprende una variante CDR1 de cadena pesada de PR1A3, la HCDR1 presenta un glutamato sustituido por una valina en la posición Kabat 31. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende tres CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y/o tres CDRs de

cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de la Tabla 2, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres CDRs. En una realización más específica, la molécula de unión a antígeno comprende tres CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDRs de cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de la Tabla 2. En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende la región o regiones variables de una cadena ligera y/o pesada de anticuerpo, preferentemente tanto una región variable de cadena pesada como una de cadena ligera. En una realización más particular, la región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera se selecciona de entre la región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera de la Tabla 4 o una combinación de las mismas, en la que la región variable de cadena pesada y de cadena ligera no es una combinación de las secuencias SEC ID nº 99 y SEC ID nº 103 o las secuencias SEC ID nº 100 y SEC ID nº 104. En una realización, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, más específicamente, un anticuerpo humanizado. En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende una región Fc. En otra realización, la molécula de unión a antígeno presenta afinidad madurada. En otra realización, la molécula de unión a antígeno presenta una actividad ADCC incrementada en comparación con PR1A3. En una realización, la ADCC incrementada de la molécula de unión a antígeno se debe a un incremento de afinidad de la molécula de unión a antígeno para el CEA unido a membrana, por ejemplo mediante maduración de afinidad u otros métodos de mejora de la afinidad (ver Tang *et al.*, J. Immunol. 179:2815-2823, 2007, el contenido completo de la cual se incorpora en la presente memoria como referencia). En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende una región Fc que ha sido glucomanipulada. En otro aspecto, la invención también se refiere a métodos de preparación de dichas moléculas de unión a antígeno y a su utilización en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de la proliferación celular en los que se expresa CEA, particularmente en las que CEA se expresa anormalmente (por ejemplo se sobreexpresa o se expresa en un patrón diferente en la célula) en comparación con tejido normal del mismo tipo celular. Entre dichos trastornos se incluyen, aunque sin limitación, el cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer

pancreático y cáncer de mama. Los niveles de expresión de CEA pueden determinarse mediante métodos conocidos de la técnica y aquellos descritos en la presente memoria (por ejemplo mediante ensayo de inmunohistoquímica, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de inmunoenzima, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, transferencia western, unión de ligando, actividad de quinasa, etc.).

[0082] En otro aspecto, la invención también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo PR1A3, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad de dichas regiones determinantes de complementariedad. Típicamente, dichos polinucleótidos aislados codifican uno o más polipéptidos de fusión que forman una molécula de unión a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de una o más (por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDRs proporcionadas en la Tabla 2, posteriormente, que comprende los residuos de las CDRs que conservan la especificidad de unión. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica por lo menos tres CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y/o tres CDRs de cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de la Tabla 2, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad (SDRs) para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización más específica, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende tres CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDRs de cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de la Tabla 2. En otra realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la región o regiones variables de una cadena ligera y/o pesada de anticuerpo. Los polinucleótidos codificantes de los polipéptidos de región variable de cadena pesada y de cadena ligera pueden expresarse en uno o más vectores de expresión. En una realización más particular, el polinucleótido codificante de una región variable de cadena pesada y/o de cadena ligera se selecciona de entre el grupo de polinucleótidos presentado en la Tabla 5 o una combinación de los mismos, en la que, las regiones variables de cadena pesada y

de cadena ligera no se encuentran codificadas por una combinación de las secuencias SEC ID nº 11 y nº 115 o de las secuencias SEC ID nº 112 y nº 116. En una realización, los polipéptidos de región variable de cadena pesada y de cadena ligera codificados por los polinucleótidos se combinan para formar un anticuerpo quimérico, más específicamente un anticuerpo humanizado. En una realización específica, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la CDR1 de cadena pesada de PR1A3 o una variante de la misma, dicho polinucleótido codifica un glutamato sustituido por una valina en la posición Kabat 31. En otra realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una región Fc. La invención se refiere además a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos. En una realización, el polipéptido codificado por los polinucleótidos anteriormente indicados comprende una región Fc. En una realización más específica, los polipéptidos codificados por los polinucleótidos se encuentran glucomanipulados para presentar un patrón alterado de glucosilación en la región de Fc. En una realización particular, la afinidad para el CEA unido a membrana de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos se encuentra incrementada en comparación con el anticuerpo parental PR1A3. En otra realización, el polipéptido codificado por el polinucleótido presenta una actividad ADCC incrementada. En una realización, la ADCC incrementada del polipéptido codificado por el polinucleótido se debe a un incremento de la afinidad del polipéptido para CEA unido a membrana, por ejemplo mediante maduración de afinidad u otros métodos de mejora de la afinidad. En otro aspecto, la invención se refiere además a la utilización de los polipéptidos (por ejemplo moléculas de unión a antígeno) codificados por los polinucleótidos en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de proliferación celular en los que se expresa CEA, particularmente en los que CEA se encuentra anormalmente expresado (por ejemplo sobreexpresado o expresado en un patrón diferente en la célula) en comparación con el tejido normal del mismo tipo celular. Entre dichos trastornos se incluyen, aunque sin limitación, el cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama. Los niveles de expresión de CEA pueden determinarse mediante métodos conocidos de la técnica y aquellos descritos en la presente memoria (por ejemplo mediante ensayo de inmunohistoquímica, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de inmunoenzima, ELISA, citometría de flujo,

radioinmunoensayo, transferencia western, unión de ligando, actividad de quinasa, etc.).

[0083] En una realización particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno humanizada o a una parte o fragmento de la misma específica para CEA unido a membrana, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende cualquier secuencia de entre SEC ID nº 101, 107 ó 188 a 206. En otra realización, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno humanizada o a una parte o fragmento de la misma específica para CEA unido a membrana que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de cualquiera de las secuencias SEC ID nº 105, 108 ó 207 a 216. En una realización particular, la molécula de unión a antígeno humanizada, o una parte o fragmento de la misma específico para CEA unido a membrana comprende una región variable de cadena pesada que comprende cualquier secuencia de entre SEC ID nº 101, 107 ó 188 a 206 y una región variable de cadena ligera que comprende cualquier secuencia de entre SEC ID nº 105, 108 ó 207 a 216. En una realización, la molécula de unión a antígeno humanizada comprende además una región constante de cadena pesada humana y/o una región constante de cadena ligera humana. Dichas regiones constantes se describen en la presente memoria y son conocidas de la técnica. En una realización más particular, la molécula de unión a antígeno humanizada comprende una región Fc, más particularmente, una región Fc que ha sido glucomanipulada.

[0084] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos de la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse ABMs humanizadas de la presente invención según los métodos de la patente US nº 5.225.539 de Winter, la patente US nº 6.180.370 de Queen *et al.*, o la patente US nº 6.632.927 de Adair *et al.*, el contenido completo del as cuales se incorpora en la presente memoria como referencia. Preferentemente, en un anticuerpo humanizado se han introducido uno o más residuos aminoácidos procedente de una fuente que es no humana. Dichos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "importados", que típicamente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327, 1988; Verhoeven *et al.*, Science 239:1534-1536, 1988) mediante la

sustitución de secuencias de región hipervariable para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US nº 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Típicamente, los anticuerpos humanizados son anticuerpo humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos de un anticuerpo no humano (por ejemplo de roedor). Los anticuerpos anti-CEA humanizados de la invención opcionalmente comprende regiones constantes de una inmunoglobulina humana.

[0085] La elección de dominios variables de cadena ligera y pesada humanas para preparar los anticuerpos humanizados resulta muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "de ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo donante (por ejemplo de roedor) se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana más similar a la del donante (por ejemplo roedor) seguidamente se acepta como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296, 1993; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901, 1987). Otro método para seleccionar la secuencia de marco humana es comparar la secuencia de cada subregión individual del marco completo del donante (por ejemplo de roedor) (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) o alguna combinación de las subregiones individuales (por ejemplo FR1 y FR2) frente a una biblioteca de secuencias de región variable humana conocidas que corresponden a dicha subregión de marco (por ejemplo según determinación mediante numeración Kabat) y se selecciona la secuencia humana para cada subregión o combinación que es más similar a la del roedor (Leung, solicitud publicada de patente US nº 2003/0040606A1, publicada el 27 de febrero de 2003). Otro método utiliza una región particular de marco derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623, 1993). En una realización, las regiones de marco humanas se seleccionan de entre una colección de secuencias de línea germinal humana. Dichas colecciones de secuencias de línea germinal humana pueden encontrarse en bases de datos tales como IMGT o VBase. Las

regiones de marco pueden seleccionarse individualmente (por ejemplo la FR1-3 seleccionada para el aceptor de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de las ABMs anti-CEA humanizadas pueden encontrarse codificadas por diferentes genes de la línea germinal) o como parte del mismo gen de la línea germinal. En una realización más específica, FR1-3 de cadena pesada se encuentra codificada por la secuencia génica de la línea germinal de inmunoglobulina humana IGHV7_4_1*02 (nº de acceso X62110, SEC ID nº 114). En otra realización específica, FR1-3 de cadena ligera se encuentra codificada por la secuencia génica de línea germinal de la inmunoglobulina humana IGHV7_4_1*02 (nº de acceso X59315, SEC ID nº 118). En otra realización específica, la FR4 de cadena pesada se encuentra codificada por la secuencia génica de la línea germinal JH6 (ver el nº de acceso GenBank M63030). En otra realización específica, la FR4 de cadena ligera se encuentra codificada por la secuencia génica de la línea germinal JK2 (ver el nº de acceso GenBank X61584).

[0086] Resulta generalmente deseable que las moléculas de unión a antígeno, tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos, se hayan humanizado con retención de una afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Por consiguiente, en una realización, se preparan anticuerpos humanizados mediante el análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran comúnmente disponibles y resultarán familiares para el experto en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas seleccionadas de inmunoglobulina. El análisis de estas visualizaciones ayuda a elucidar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, por ejemplo el análisis de los residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos de FR procedentes de secuencias del receptor y de importación de manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad incrementada para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable se

encuentran directa y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión a antígeno.

[0087] En un aspecto, la invención se refiere a moléculas de unión a antígeno anti-CEA humanizadas de afinidad madurada y/o variantes, que presentan propiedades y características deseables, incluyendo, aunque sin limitación: afinidad de unión fuerte para el antígeno CEA--en particular, CEA unido a membrana--presentando simultáneamente sustancialmente ninguna reactividad cruzada contra CEA soluble, una capacidad de inducir lisis celular de células que expresan CEA *in vitro* y *ex vivo*, preferentemente de un modo dependiente de la dosis, una capacidad de inhibir la adhesión celular mediada por CEA *in vitro*, una capacidad de inhibir el crecimiento del tejido tumoral y/o de inducir la regresión del tejido tumoral (por ejemplo tal como se ha demostrado en modelos tumorales (por ejemplo de xenoinjerto en el ratón).

[0088] Tal como se indica en la presente memoria, en algunas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno de la invención presentan una afinidad de unión incrementada, por ejemplo debido a la maduración de la afinidad de un anticuerpo parental que comprende una o más CDRs del anticuerpo PR1A3. La afinidad de las moléculas de unión a antígeno de la invención puede determinarse mediante métodos conocidos de la técnica y tal como se describe en la presente memoria. En una realización específica, las moléculas de unión a antígeno anti-CEA humanizadas o variantes de la invención se unen a CEA humano, preferentemente CEA unido a membrana, con un valor de constante de afinidad monovalente (K_D) entre un valor no superior a aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 0,001 nM, más específicamente entre un valor no superior a aproximadamente 800 nM y aproximadamente 1 nM, y todavía más específicamente, entre un valor no superior a aproximadamente 550 nM y aproximadamente 10 nM. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno anti-CEA variante es un anticuerpo de afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de constante de afinidad monovalente (K_D) de entre un valor no superior a aproximadamente 100 nM y aproximadamente 10 nM.

[0089] En una realización, la molécula de unión a antígeno de la invención típicamente se une al mismo epítipo reconocido por el anticuerpo PR1A3 de ratón, o es capaz de competir con el anticuerpo PR1A para la unión a CEA unido a membrana. Para el cribado de anticuerpos que se unen al epítipo sobre CEA

humano ligado por un anticuerpo de interés (por ejemplo aquellos que bloquean la unión del anticuerpo PR1A3 a CEA humano), puede llevarse a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinarios tal como el descrito en ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow y Lane, editores, 1988. Alternativamente, puede llevarse a cabo el mapado de los epítomos, por ejemplo tal como se describe en Champe *et al.*, J. Biol. Chem. 270:1388-1394, 1995, para determinar si el anticuerpo se une a un epítomo de interés.

[0090] En una realización, se prepara un antígeno variante que se une a moléculas específicas para CEA humano a partir de una molécula de unión a antígeno anti-CEA parental que comprende por lo menos una CDR del anticuerpo monoclonal PR1A3, en el que el anticuerpo parental anti-CEA se une al mismo epítomo que el anticuerpo PR1A3 y es capaz de competir con PR1A3 para la unión al antígeno. En una realización, la molécula parental de unión a antígeno comprende por lo menos una, dos o típicamente tres CDRs de cadena pesada del anticuerpo PR1A; en otra realización, la molécula parental de unión a antígeno comprende por lo menos una, dos, o típicamente tres CDRs de cadena ligera del anticuerpo PR1A3; en otra realización, la molécula parental de unión a antígeno comprende las tres CDRs de cadena pesada y las tres CDRs de cadena ligera del anticuerpo PR1A3. Preferentemente, en el caso de que la molécula de unión a antígeno comprende HCDR1 de PR1A3, dicha HCDR1 comprende una sustitución de glutamato por valina en la posición Kabat 31. Las ABMs variantes típicamente presentan una afinidad mayor para CEA que la parental. En una realización, la ABM variante comprende una región Fc. En una realización, la ABM variante ha sido glucomanipulada. En una realización, la ABM variante presenta una actividad ADCC incrementada en comparación con la ABM parental. En una realización particular, la ADCC incrementada es el resultado de la afinidad incrementada alcanzada, por ejemplo, mediante maduración de la afinidad de la ABM parental para generar la ABM variante. En una realización más particular, el incremento de la ADCC es de entre por lo menos aproximadamente 40% y aproximadamente 100% en comparación con dicha molécula parental de unión a antígeno. En otra realización particular, la ABM variante incrementa la ADCC entre por lo menos aproximadamente 10% y aproximadamente 100% en un ensayo *in vitro* de citotoxicidad. En una realización más particular, la ABM variante es entre por lo

menos 10 veces y aproximadamente 1.000 veces más potente en la inducción de la ADCC a una concentración dada que el anticuerpo PR1A3 murino. En otra realización particular, la actividad ADCC incrementada es un resultado de la glucomanipulación de la región Fc. En otra realización particular, la actividad ADCC incrementada es el resultado de una combinación de afinidad incrementada y glucomanipulación.

[0091] En una realización, las moléculas de unión a antígeno variantes de la invención comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en por lo menos una CDR. El número de sustituciones de aminoácidos puede encontrarse comprendido entre uno y diez (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10), preferentemente entre dos y cinco (por ejemplo 2, 3, 4 ó 5). En una realización, por lo menos una CDR de cadena pesada comprende una o más sustituciones de aminoácidos. En otra realización, por lo menos una CDR de cadena ligera comprende una o más sustituciones de aminoácidos. En otra realización, por lo menos una CDR de cadena pesada comprende una o más sustituciones, y por lo menos una CDR de cadena ligera comprende una o más sustituciones. Preferentemente, en el caso de que la molécula de unión a antígeno comprende HCDR1 de PR1A3, dicha HCDR1 comprende una sustitución de glutamato por valina en la posición Kabat 31.

[0092] Se consiguen modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas de las moléculas de unión a antígeno mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo en conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las moléculas de unión a antígeno variantes que comprenden sustituciones de aminoácidos pueden presentar actividades biológicas mejoradas, por ejemplo una afinidad de unión a antígeno mejorada y una ADCC incrementada, en comparación con la molécula parental de unión a antígeno. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos mediante diversas técnicas conocidas de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la mutagénesis dirigida a sitio y/o la maduración de la afinidad de la molécula parental de unión a antígeno, por ejemplo mediante expresión fágica.

[0093] Con el fin de identificar sitios candidatos, por ejemplo residuos de región hipervariable, para la modificación, puede llevarse a cabo la mutagénesis mediante rastreo de alaninas para encontrar residuos que contribuyen significativamente a la unión de los antígenos. Alternativamente, o adicionalmente, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y CEA humano. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según los métodos conocidos de la técnica y/o descritos en la presente memoria. Tras generar dichas variantes, el panel de variantes puede cribarse mediante métodos conocidos de la técnica y/o descritos en la presente memoria y pueden seleccionarse para su desarrollo posterior anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes.

[0094] Puede utilizarse la expresión fágica para generar un abanico de secuencias de región variable a partir de una molécula parental de unión a antígeno que contenga una o más mutaciones aleatorias de aminoácidos. Por ejemplo, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6 a 7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Alternativamente, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en regiones variables de cadena pesada y/o ligera. Pueden generarse mutaciones mediante técnicas conocidas de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la utilización de cebadores de mutagénesis, el control del número de ciclos y la utilización de los análogos nucleótidos mutagénicos 8-oxo-dGTP y dPTP durante la amplificación por PCR. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de un modo monovalente a partir de partículas de fago filamentoso como fusiones del producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas en fago seguidamente se criban para sus actividades biológicas (por ejemplo para la afinidad de unión) tales como las dadas a conocer en la presente memoria y los candidatos que presentan una o más actividades mejoradas se utilizan para el desarrollo posterior. Pueden encontrarse métodos para preparar bibliotecas de expresión fágica en Huse *et al.*, Science 246:1275-1281, 1989, Proc. Nat'l Acad. Sci., USA 88:4363-4366, 1991, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia. Un método alternativo para identificar las moléculas de unión a antígeno de afinidad madurada puede

encontrarse en, por ejemplo, la patente US nº 7.432.063 de Balint *et al.*, el contenido completo de la cual se incorpora en la presente memoria como referencia.

[0095] En algunas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno de la presente invención comprenden una región Fc, preferentemente una región Fc humana. Las secuencias y estructuras de las regiones Fc son conocidas de la técnica y han sido caracterizadas. En una realización específica, la región constante humana es IgG1, tal como se proporciona en las secuencias SEC ID nº 121 y nº 122, y proporcionada a continuación:

Secuencia de nucleótidos de IgG1 (SEC ID nº 121)

```
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC
AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG
AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCG
GCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG
TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
ACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTGAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCCTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
TGA
```

Secuencia de aminoácidos de IgG1 (SEC ID nº 122)

```
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKAEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
```

NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0096] Sin embargo, las variantes e isoformas de la región Fc humana también se encuentran comprendidas dentro de la presente invención. Por ejemplo, pueden producirse regiones Fc variantes adecuadas para la utilización en la presente invención según los métodos enseñados en la patente US nº 6.737.056 de Presta (variantes de región Fc con función efectora alterada debido a una o más modificaciones de aminoácidos) o en las solicitudes de patente US nº 60/439.498, nº 60/456.041, nº 60/514.549 o en la patente WO nº 2004/063351 (regiones Fc variantes con una afinidad de unión incrementada debido a una modificación de aminoácido) o en la solicitud de patente US nº 10/672.280 o la patente WO nº 2004/099249 (variantes Fc con unión alterada a FcγR debido a una modificación de aminoácido), el contenido de cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. En una realización particular, las ABMs anti-CEA y ABMs variantes comprenden una región Fc que ha sido glucomanipulada para alterar la actividad de función efectora de la ABM (por ejemplo fucosilación reducida, mejora de la afinidad de unión de receptor de Fc, ADCC incrementada, etc.). Los métodos de glucomanipulación que pueden utilizarse se describen en detalle posteriormente en la presente memoria y son conocidos de la técnica.

[0097] En una realización, la molécula de unión de antígeno de la presente invención se conjuga con un grupo adicional, tal como un marcaje radioactivo o una toxina. Dichas moléculas de unión a antígeno conjugadas pueden producirse mediante numerosos métodos que son bien conocidos de la técnica. Los conjugados de ABM anti-CEA de la invención se describen en detalle posteriormente en la presente memoria en la sección titulada "Conjugados de molécula de unión a antígeno anti-CEA".

Polipéptidos y polinucleótidos de las ABMs anti-CEA

[0098] En un aspecto, la presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno y polipéptidos que presentan la misma especificidad de unión del

anticuerpo PR1A3 murino (por ejemplo la unión del mismo epítipo de CEA unido a membrana) y que presentan actividades biológicas comparables o mejoradas (por ejemplo una afinidad mejorada para CEA unido a membrana y/o una ADCC incrementada). En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende una o más CDRs proporcionadas en la Tabla 2, posteriormente. En una realización más específica, la molécula de unión a antígeno comprende 3 CDRs de cadena pesada de la Tabla 2, posteriormente. En otra realización específica, la molécula de unión a antígeno comprende 3 CDRs de cadena ligera en la Tabla 2, posteriormente. En otra realización específica, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno específica para CEA humano unido a membrana, que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11 y SEC ID nº 12, (b) una secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23 y SEC ID nº 24, y (c) una secuencia de CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27, SEC ID nº 28, SEC ID nº 29, SEC ID nº 30, SEC ID nº 31, SEC ID nº 32, SEC ID nº 33, SEC ID nº 34 y SEC ID nº 35. En otra realización específica, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno específica para CEA humano unido a membrana, que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 36, SEC ID nº 37, SEC ID nº 38, SEC ID nº 39, SEC ID nº 40, SEC ID nº 41, SEC ID nº 42, SEC ID nº 43, SEC ID nº 44 y SEC ID nº 45, (b) una secuencia de CDR de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 46 y SEC ID nº 47, SEC ID nº 48, SEC ID nº 49, SEC ID nº 50, SEC ID nº 51, SEC ID nº 52, SEC ID nº 53, SEC ID nº 54 y SEC ID nº 55, y (c) una CDR3 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 56. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno o presenta ninguna reactividad cruzada sustancial contra CEA humano soluble. En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada y/o ligera humana. Por ejemplo, en una realización, la molécula de unión a antígeno comprende una región Fc. En una realización más específica, la molécula de unión a antígeno

comprende una región Fc que ha sido glucomanipulada. La invención se refiere además a polinucleótidos codificantes de cualquiera de las moléculas de unión a antígeno de la invención específicas para CEA humano unido a membrana.

[0100] En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno específica para CEA humano unido a membrana que comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera. En una realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 101. En otra realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% respecto a la secuencia SEC ID nº 101. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 105. En otra realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% respecto a la secuencia SEC ID nº 105.

[0101] En una realización, la molécula de unión a antígeno específica para CEA humano unido a membrana comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En una realización específica, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 4 siguiente:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEX¹X²MX³WVRQ
APGQGLEWMGX⁴INTKX⁵GEAX⁶YX⁷EEFKGRFVFSLDTSVST
AYLQISSLKAEDTAVYYCARWDX⁸X⁹X¹⁰YX¹¹X¹²X¹³X¹⁴DYWG
QGTTVTVSS

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

[0102] En una realización específica, la región variable de cadena ligera comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 11 siguiente:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASX¹⁵X¹⁶X¹⁷X¹⁸X¹⁹X²⁰VAW
YQQKPGKAPKX²¹LIYX²²ASX²³X²⁴X²⁵X²⁶GVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIK

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

[0103] En otra realización específica, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 107. En otra realización específica, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 107. En otra realización específica, la región variable de cadena ligera del antígeno comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 108. En otra realización específica, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 108. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende un polipéptido de cadena pesada que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 101, 107 y 188 a 206, y un polipéptido de cadena ligera que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: las secuencias SEC ID nº 105, 108 y 207 a 216. Una molécula de unión a antígeno que comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera es específica para CEA, en particular CEA unido a membrana. En una realización, una molécula de unión a antígeno que comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera no presenta ninguna reactividad cruzada sustancial contra CEA soluble. En otra realización, la cadena pesada comprende además una región Fc. En una realización específica, la región Fc ha sido glucomanipulada para que presenta un grado reducido de fucosilación de los oligosacáridos N-ligados, tal como se indica en detalle posteriormente en la presente memoria.

[0104] En un aspecto, la invención se refiere además a un polipéptido aislado que comprende una o más CDRs proporcionadas en la Tabla 2. En una realización, el polipéptido aislado comprende: una secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº

10, SEC ID nº 11 y SEC ID nº 12, (b) una secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23 y SEC ID nº 24, y (c) una secuencia de CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de: las secuencias SEC ID nº 25, SEC ID nº 26, SEC ID nº 27, SEC ID nº 28, SEC ID nº 29, SEC ID nº 30, SEC ID nº 31, SEC ID nº 32, SEC ID nº 32, SEC ID nº 33, SEC ID nº 34 y SEC ID nº 35. En una realización, el polipéptido aislado comprende una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a la secuencia SEC ID nº 107. En otra realización, la invención se refiere a un polipéptido que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 36, SEC ID nº 37, SEC ID nº 38, SEC ID nº 39, SEC ID nº 40, SEC ID nº 41, SEC ID nº 42, SEC ID nº 43, SEC ID nº 44 y SEC ID nº 45, (b) una secuencia de CDR de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de: la secuencia SEC ID nº 46 y las secuencias SEC ID nº 47, SEC ID nº 48, SEC ID nº 49, SEC ID nº 50, SEC ID nº 51, SEC ID nº 52, SEC ID nº 53, SEC ID nº 54 y SEC ID nº 55, y (c) una CDR3 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 56. En una realización, el polipéptido aislado comprende una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a la secuencia SEC ID nº 108. En otro aspecto, la invención se refiere además a polinucleótidos codificantes de cualquiera de dichos polipéptidos y moléculas de unión a antígeno que comprenden cualquiera de dichos polipéptidos. Una molécula de unión a antígeno que comprende el polipéptido es específica para CEA, en particular CEA unido a membrana. En una realización, la molécula de unión a antígeno no presenta ninguna reactividad cruzada sustancial con el CEA soluble humano. En una realización, el polipéptido comprende además una región constante de cadena pesada y/o ligera humana. En otra realización, el polipéptido comprende una región Fc, más particularmente una región Fc glucomanipulada. En una realización específica, la región Fc ha sido glucomanipulada para presentar un grado reducido de fucosilación de los oligosacáridos N-ligados, tal como se indica en detalle en la presente memoria.

[0105] En otro aspecto, la invención se refiere además a polinucleótidos aislados codificantes de molécula de unión a antígeno específicas para CEA humano unido a membrana. En una realización, el polinucleótido aislado comprende una o más secuencias de CDR mostradas en la Tabla 3, posteriormente, o una combinación de las mismas, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que, como parte de una molécula de unión a antígeno, se une específicamente a CEA, particularmente CEA unido a membrana. En una realización, el polinucleótido aislado comprende una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una o más secuencias de región variable mostradas en la Tabla 5. En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende un primer polinucleótido aislado que comprende una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 113, nº 119 y nº 159 a nº 177, y un segundo polinucleótido aislado que comprende una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 117, nº 120 y nº 178 a nº 187. En una realización, el polinucleótido codifica una cadena pesada que comprende una región variable y una región constante (por ejemplo una región constante de IgG o fragmento de la misma, en particular una región constante de IgG que comprende una región Fc). En una realización, el polinucleótido codifica una cadena ligera que comprende una región variable y una región constante (por ejemplo una región constante kappa o lambda). En una realización, las moléculas de unión a antígeno codificadas por dichos polinucleótidos aislados no presentan ninguna reactividad cruzada sustancial contra el CEA soluble humano.

[0106] En otra realización, la invención también comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta una secuencia que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: las secuencias SEC ID nº 101, nº 105, nº 107, nº 108 y nº 188 a nº 216 con sustituciones conservadoras de aminoácidos, en las que una molécula de unión a antígeno que comprende el polipéptido (por ejemplo una molécula de unión a

antígeno que comprende un polipéptido que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: las secuencias SEC ID nº 101, nº 107 y nº 188 a nº 206 y un polipéptido que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntico a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 105, nº 108 y nº 207 a nº 216) se une específicamente a CEA, particularmente a CEA unido a membrana. En una realización, el polipéptido comprende además una región constante humana. En una realización específica, el polipéptido comprende una región Fc humana. En una realización más específica, la región Fc es una región Fc de IgG glucomanipulada.

[0107] En una realización, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende: (a) una secuencia codificante de una CDR1 de secuencia pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 57 a nº 59 y nº 61, (b) una CDR2 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 62 a nº 66, y (c) una secuencia de CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 67 a nº 77. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende: (a) una secuencia de CDR1 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 78 a nº 88, (b) una secuencia de CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 89 a nº 97, y (c) una secuencia de CDR3 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 98.

TABLA 2

CDR		Secuencia de aminoácidos	SEC ID nº
CDR1 de cadena pesada	Kabat	EFGMN	1
		EYGMN	2
		EYSMN	3
		EFGMS	5
	Chothia	GYTFTEF	6
		GYTFTEY	7
	AbM	GYTFTEFGMN	8
		GYTFTEYGMN	9
		GYTFTEYSMN	10
		GYTFTEFGMS	12

CDR		Secuencia de aminoácidos	SEC ID nº
CDR2 de cadena pesada	Kabat	WINTKTGEATYVEEFKG	13
		WINTKTGEATYIEEFKG	14
		WINTKSGEATYVEEFKG	15
		YINTKNGEANYVEEFKG	16
		WINTKNGEATYIEEFKG	17
	Chothia	NTKTGEAT	18
		NTKSGEAT	19
		NTKNGEAN	20
	AbM	WINTKTGEAT	21
		WINTKSGEAT	22
		YINTKNGEAN	23
		WINTKNGEAT	24
CDR3 de cadena pesada	Kabat Chothia y AbM	WDFYDYVEAMDY	25
		WDFYHYVEAMDY	26
		WDFVDYVEAMDY	27
		WDFYWYVEAMDY	28
		WDAFEYVKALDY	29
		WDFFEYFKTMDY	30
		WDFFYYVQTMDY	31
		WDFSYYVEAMDY	32
		WDFAHYFQTMDY	33
		WDFAYYFQTMDY	34
		WDFAYYLEAMDY	35
		CDR1 de cadena ligera	
KASANVGNNVA	37		
KASKNVGTNVA	38		
KASAAVGTYYVA	39		
KASQYASTNVA	40		
KASHNVGTNVA	41		
KASQIMGPNVA	42		
KASQIVGTNVA	43		
KASQKVLTNVA	44		
KASQTVSANVA	45		
CDR2 de cadena ligera		SASYRYS	46
		YLASNLSG	47
		YLASYPQI	48
		YSASYRKR	49
		YWASYRYS	50
		YSASHRYS	51
		YLASYHES	52
		YSASHRPS	53
		YLASYRYS	54
CDR3 de cadena ligera		YLASYRYR	55
		HQYYTYPLFT	56

TABLA 3

CDR	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID nº
CDR1 de cadena pesada	GGATACACCTTCACTGAGTTTGGGAATGAAC	57
	GGATACACCTTCACTGAGTATGGTATGAAC	58
	GGATACACCTTCACTGAGTATTCTATGAAC	59
	GGATACACCTTCACTGAGTTTGGGAATGAGC	61
CDR2 de cadena pesada	TGGATAAACACCAAAACTGGAGAGGCAACATA TGTTGAAGAGTTTAAGGGA	62
	TGGATAAACACCAAAACTGGAGAGGCAACATA TATTGAAGAGTTTAAGGGA	63
	TGGATAAACACCAAAAGTGGAGAGGCAACATA TGTTGAAGAGTTTAAGGGA	64
	TATATAAACACCAAAAATGGAGAGGCAAACTA TGTTGAAGAGTTTAAGGGA	65
	TGGATAAACACCAAAAATGGAGAGGCAACATA TATTGAAGAGTTTAAGGGA	66
CDR3 de cadena pesada	TGGGACTTCTATGATTACGTGGAGGCTATGGA CTAC	67
	TGGGACTTCTATCATTACGTGGAGGCTATGGA CTAC	68
	TGGGACTTCGTGGATTACGTGGAGGCTATGG ACTAC	69
	TGGGACTTCTATTGGTACGTGGAGGCTATGGA CTAC	70
	TGGGACGCCTTTGAGTACGTGAAGGCGCTGG ACTAC	71
	TGGGATTTCTTTGAGTATTTTAAGACTATGGA CTAC	72
	TGGGACTTTTTTTTATTACGTGCAGACTATGGA CTAC	73
	TGGGATTTTTCTTATTACGTTGAGGCGATGGA CTAC	74
	TGGGACTTTGCTCATTACTTTCAGACTATGGA CTAC	75
	TGGGACTTCGCTTATTACTTTCAGACTATGGA CTAC	76
	TGGGATTTGCGGTATTACCTTGAGGCTATGGA CTAC	77
CDR1 de cadena ligera	AAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTTGC C	78
	AAGGCCAGTGCCAATGTGGGTAATAATGTTG CC	79
	AAGGCCAGTAAGAATGTGGGGACTAATGTTG CG	80

CDR	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID nº
	AAGGCCAGTGCGGCTGTGGGTACGTATGTTG CG	81
	AAGGCCAGTCAGATAGCGAGTACTAATGTTG CC	82
	AAGGCCAGTCACAATGTGGGTACCAACGTTG CG	83
	AAGGCCAGTCAGATTATGGGTCCTAATGTTGC G	84
	AAGGCCAGTCAAATTGTGGGTACTAATGTTGC G	85
	AAGGCCAGTCAGAAGGTGCTTACTAATGTTGC G	86
	AAGGCCAGTCGACTGTGAGTGCTAATGTTG CG	87
CDR2 de cadena ligera	TATTCGGCATCCTACCGCTACAGT	88
	TATTTGGCCTCCAACCTCTCCGGT	89
	TACCTGGCATCCTACCCCGAGATT	90
	TATTCGGCATCCTACCGCAAAAGG	91
	TATTGGGCATCCTACCGCTATAGT	92
	TATTCGGCATCCCACCGGTACAGT	93
	TATTTGGCATCCTACCACGAAAGT	94
	TATTCGGCATCCCACCGTCCCAGT	95
	TATTTGGCATCCTACCGCTACAGT	96
	TATTTGGCATCCTACCGCTACAGA	97
CDR3 de cadena ligera	CACCAATATTACACCTATCCTCTATTCACG	98

TABLA 4

CONSTRUCTO	SECUENCIA PEPTÍDICA	SEC ID Nº
VH de PR1A3	QVKLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTEFG MNWVKQAPGKGLKWMGWINTKTGEATYVEEF KGRFAFSLETSATTAYLQINNLIKNEDTAKYFCA RWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS	99
VH de pEM1496 PR1A3hu	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYY CARWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS	100
CH7A	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS	101

CONSTRUCTO	SECUENCIA PEPTÍDICA	SEC ID Nº
IGHV7-4-1*02	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSY AMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYY CAR	102
VL de PR1A3	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSQVPSRFTG SGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCHQYYTYPLF TFGSGTKLEMKRT	103
VL de pEM1495 PR1A3hu	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGTNV AWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSQVPSRFSGS GSGTDFTFTISSLQPEDATYYCHQYYTYPLFSF GQGTKVEIKR	104
CL1A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGTNV AWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSQVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF GQGTKLEIK	105
IMGT_hVK_1_39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP	106
CH7 rF9	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEY GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKSGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS	107
CLA1 rH11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQTVSANV AWYQQKPGKAPKLLIYLASYRYRGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF GQGTKLEIKRT	108
PMS22	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS	188
1C8	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTVSS	189
3E1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFVDYVEAMDYWGQGTTVTVSS	190
2D7	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYWYVEAMDYWGQGTTVTVSS	191

CONSTRUCTO	SECUENCIA PEPTÍDICA	SEC ID Nº
Cadena pesada de afinidad madurada	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFAHYFQTM DYWGQGTTTVTVSS	192
Cadena pesada de afinidad madurada	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFAYYFQTM DYWGQGTTTVTVSS	193
Cadena pesada de afinidad madurada	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFAYYLEAMDYWGQGTTITVSS	194
H3 completo (5) 19	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMSWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA RWDAFEYVKALDYWGQGTTTVTVSS	195
H3 completo (5) 8	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFFEYFKTMDYWGQGTTTVTVSS	196
H3 completo (5) 28	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFFYVQTM DYWGQGTTTVTVSS	197
H3 completo (5) 27	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFSYYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	198
Cadena pesada H4E9	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYIEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA RWDFYDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	199
pAC14 (B9)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKSGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	200
pAC15 (F9)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEY GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKSGEATYVE EFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	201
H1/H2 (5) 2	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEY SMNWVRQAPGQGLEWMGYINTKNGEANYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA RWDFYDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	202

CONSTRUCT O	SECUENCIA PEPTÍDICA	SEC ID Nº
H1/H2 (5) 11	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEY GMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKNGEATYIEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA RWDFYDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	203
H1/H2 (5) 13	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMNWVRQAPGQGLEWMGYINTKNGEANYVEE FKGRFVFSLDASVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC ARWDFYDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	204
H1/H2 (5) 14	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEY GMNWVRQAPGQGLEWMGYINTKNGEANYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA RWDFYDYVEAMDYWGQGTTTVTVSS	205
H3 Full (5) 19	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEF GMSWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA RWDAFEYVKALDYWGQGTTTVTVSS	206
pAC21 (3A1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASANVGNNV AWYQQKPGKAPKLLIYLASNRS GGVP SRFSGS SGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF QGGTKLEIKRT	207
pAC19 (2C6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASKNVGNTN AWYQQKPGKAPKPLIYLASYPQIGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFG QGGTKLEIKRT	208
pAC18 (2F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASAAVGTYV AWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGS SGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF QGGTKLEIKRT	209
pAC23 (2F11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQIASTNVA WYQQKPGKAPKLLIYWASYRYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFG QGGTKLEIKRT	210
cadena ligera H4E9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGNTN AWYQQKPGKAPKPLIYSASYRYSGVPSRFSGS SGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF QGGTKLEIKRT	211
L2D2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASHNVGNTN AWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYSGVPSRFSGS SGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF QGGTKLEIKRT	212
pAC6 (C1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQIMGPNV AWYQQKPGKAPKLLIYLASYHESGVPSRFSGS SGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF QGGTKLEIKRT	213

CONSTRUCT O	SECUENCIA PEPTÍDICA	SEC ID Nº
pAC7 (E10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIVGTNV AWYQQKPGKAPKLLIYSASHRPSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF GQGTKLEIKRT	214
pAC12 (H7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQKVLTNV AWYQQKPGKAPKLLIYLASYRYSRVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF GQGTKLEIKRT	215
pAC13 (H11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQTVSANV AWYQQKPGKAPKLLIYLASYRYRGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTF GQGTKLEIKRT	216

TABLA 5

CONSTRUCT O	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
VH de PR1A3	CAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAGT TGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC CTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAGAAT TCGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCTGG AAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAAC ACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAAG AGTTTAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAG ACCTCTGCCACCACTGCCTATTTGCAGATCAA CAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTAAATATT TCTGTGCTCGATGGGATTTCTATGACTATGTT GAAGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CCGTGACCGTCTCCTCA	111
pEM1496	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTGGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAAC ACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAAG AGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATCA GCAGCCTAAAGGCTGACGACACTGCCGTGTA TACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTACG TGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCTCA	112

CONSTRUCT O	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
CH7A	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	113
IGHV7-4- 1*02	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGCT ATGCTATGAATTGGGTGCGACAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAAC ACCAACACTGGGAACCCAACGTATGCCCAGG GCTTCACAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGA	114
VL de PR1A3	GATATCGTGATGACCCAGTCTCAAAGATTCAT GTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTC ACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTA ATGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACA ATCCCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCAC AGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAATGTACAGTCTGAAGACTTGG CGGAGTATTTCTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGT TGGAATGAAACGTACG	115
pEM1495	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCAAGCAGCC TGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCA TCACCTGTAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAC TAATGTTGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGT AAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTCGGCAT CCTACCGGTACAGTGGTGTGCCAAGCAGATT CAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACA TCGCCACCTACTACTGCCACCAATATTACACC TATCCTCTATTCAGCTTCGGCCAAGGGACCA AGGTGGAAATCAAACGT	116

CONSTRUCT O	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
CL1A	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTA ATGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTCGGCATCCT ACCGCTACAGTGGAGTCCCATCAAGGTTTCA TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCG CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAG	117
IMGT_hVK _1_39	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT CACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGC TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACC CCT	118
CH7 rF9	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TATGGTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACGAAATCTGGAGAGGCAACCTATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC	119
CLA1 rH11	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAGACTGTGAGTGCTA ATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTACTTGGCATCCT ACCGCTACAGAGGAGTCCCATCAAGGTTTCA TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCG CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	120

CONSTRUCT O	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
PMS22	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	159
1C8	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATCATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	160
3E1	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCGTGGATTA CGTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCA	161

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
2D7	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATTGGTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	162
Cadena pesada de afinidad madurada	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTTGCTCATTAC TTTCAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCTCA	163
Cadena pesada de afinidad madurada	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCGCTTATTAC TTTCAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCTCA	164

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
Cadena pesada de afinidad madurada	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGATTTGCGTATTAC CTTGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCACGATCACCGTCTCCTCA	165
H3 completo (5) 19	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGAATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCTGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACGCCTTTGAGTA CGTGAAGGCGCTGGACTACTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCA	166
H3 completo (5) 8	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGATTTCTTTGAGTAT TTTAAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCTCA	167

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
H3 completo (5) 28	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTTTTTTATTAC GTGCAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCTCA	168
H3 completo (5) 27	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGAATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGATTTTTCTTATTAC GTTGAGGCGATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACAGTCACCGTCTCCTCA	169
Cadena pesada H4E9	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA TACCAAACTGGAGAGGCAACTTATATTGAAG AGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATCA GCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGTA TTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTACG TGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCTCA	170

CONSTRUCT O	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
pAC14 (B9)	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAAAGTGGAGAGGCAACCTATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	171
pAC15 (F9)	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TATGGTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACGAAATCTGGAGAGGCAACCTATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	172
H1/H2 (5) 2	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TATTCTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATACATAAA CACCAAAAATGGAGAGGCAAACCTATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	173

CONSTRUCT O	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
H1/H2 (5) 11	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TATGGTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAAAATGGAGAGGCAACCTATATTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	174
H1/H2 (5) 13	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATATAAA CACCAAAAATGGAGAGGCAAACCTATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CGCCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	175
H1/H2 (5) 14	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TATGGTATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATATAAA CACCAAAAATGGAGAGGCAAACCTATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	176

CONSTRUCT O	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
H3 Completo (5) 19	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGT TGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG TTTGGGAATGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATAAA CACCAAACTGGAGAGGCAACATATGTTGAA GAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGA CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATC AGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCTGTGT ATTACTGTGCGAGATGGGACGCCTTTGAGTA CGTGAAGGCGCTGGACTACTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCA	177
pAC21 (3A1)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTGCCAATGTGGGTAATA ATGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTTGGCCTCCA ACCGCTCCGGTGGAGTCCCATCAAGGTTTCAG TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCG CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	178
pAC19 (2C6)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTAAGAATGTGGGGACTA ATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCCCCTGATCTACCTGGCATCC TACCCCCAGATTGGAGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTC GCAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTA TCCCCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAG CTCGAGATCAAGCGTACG	179
pAC18 (2F1)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTGCGGCTGTGGGTACGT ATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTCGGCATCCT ACCGCAAAGGGGAGTCCCATCAAGGTTTCAG TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCG CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	180

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
pAC23 (2F11)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAGATAGCGAGTACTA ATGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTGGGCATCCT ACCGCTATAGTGGAGTCCCATCAAGGTTGAG TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCG CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	181
cadena ligera H4E9	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTA ATGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCCCCTGATCTATTTCGGCATCC TACCGCTACAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTC GCAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTA TCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAG CTCGAGATCAAGCGTACG	182
L2D2	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCACAATGTGGGTACCA ACGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTTCGGCATCC CACCGGTACAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTC GCAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTA TCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAG CTCGAGATCAAGCGTACG	183
pAC6 (C1)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAGATTATGGGTCCTA ATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTTGGCATCCT ACCACGAAAGTGGAGTCCCATCAAGGTTGAG TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCG CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	184

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID Nº
pAC7 (E10)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAAATTGTGGGTACTA ATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTCGGCATCC CACCGTCCCAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTT GCAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTA TCCTCTATTCACGTTTGGCCAGGGCACCAAG CTCGAGATCAAGCGTACG	185
pAC12 (H7)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAGAAGGTGCTTACTA ATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTATTTGGCATCCT ACCGCTACAGTGGAGTCCCATCAAGGTTTCA TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTC CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	186
pAC13 (H11)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCT GTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCAAGGCCAGTCAGACTGTGAGTGCTA ATGTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCACCTAAGCTCCTGATCTACTTGGCATCCT ACCGCTACAGAGGAGTCCCATCAAGGTTTCA TGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTC CAACTTACTACTGTCACCAATATTACACCTAT CCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	187

Vectores de expresión y células huésped

[0108] En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión y/o una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente invención. Por ejemplo, la célula huésped o vector de expresión comprende uno o más polinucleótidos cualesquiera, o polinucleótidos codificantes de los polipéptidos, ABMs y/o ABMs variantes indicadas anteriormente en las secciones tituladas "Moléculas de unión a antígeno anti-CEA" y "Polipéptidos y

polinucleótidos de ABMs anti-CEA". En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de una ABM que se une específicamente a CEA humano unido a membrana, comprendiendo el método: cultivar una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente invención o un vector de expresión que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente invención en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido o polinucleótidos, en el que dicho polinucleótido o polinucleótidos codifica uno o más polipéptidos que forman parte de la ABM, y recuperar dicha ABM, en donde dicha ABM o una parte de la misma se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3 o es capaz de competir para la unión con el mismo.

[0109] Generalmente, puede utilizarse cualquier tipo de línea celular en cultivo para expresar la ABM de la presente invención. En una realización preferente, se utilizan células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales, como la línea celular de fondo para generar las células huésped manipuladas de la invención.

[0110] En una realización específica, la célula huésped o vector de expresión comprende uno o más polinucleótidos codificantes de una ABM que es un anticuerpo variante o un fragmento del mismo que presenta la especificidad de unión del anticuerpo PR1A3 murino, por ejemplo la ABM se une al mismo epítipo que el de PR1A3 o es capaz de competir con el anticuerpo PR1A3 para la unión al antígeno. En una realización preferente, el anticuerpo presenta una afinidad madurada. El anticuerpo de afinidad madurada generalmente presenta una afinidad de unión mejorada respecto a la del anticuerpo de referencia a partir del que se deriva el anticuerpo de afinidad madurada. En otra realización preferente, el anticuerpo presenta propiedades terapéuticas deseables, incluyendo, aunque sin limitación: una fuerte afinidad de unión para el antígeno CEA, en particular CEA unido a membrana, no presentando ninguna reactividad cruzada sustancial contra CEA soluble; una capacidad de inducir la lisis celular de células que expresan CEA *in vitro* y *ex vivo*, preferentemente de una manera dependiente de la dosis, una capacidad de inhibir la adhesión celular mediada por CEA *in vitro*; una capacidad de

inhibir la adhesión celular *in vitro* mediada por CEA; una capacidad de inhibir el crecimiento del tejido tumoral y/o de inducir la regresión del tejido tumoral en modelos de tumor en ratones (por ejemplo de xenoinjerto en el ratón). En otra realización preferente, el anticuerpo variante o fragmento del mismo comprende un Fc humano.

[0111] En una realización, puede expresarse uno o varios polinucleótidos codificantes de una ABM de la presente invención bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulado. Entre los sistemas de expresión regulados que resultan adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión de interruptor lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema promotor inducible por la temperatura, y un sistema de expresión metalotioneína inducible por un metal. En el caso de que se encuentren comprendidos varios ácidos nucleicos diferentes codificantes de una ABM de la presente invención dentro del sistema celular huésped, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. El nivel de expresión máximo se considera que es el nivel más alto posible de expresión estable de polipéptido que no presenta ningún efecto adverso significativo sobre la tasa de crecimiento celular, y se determina mediante experimentación rutinaria. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos generalmente conocidos de la técnica, incluyendo el análisis de transferencia western utilizando un anticuerpo específico para la ABM o un anticuerpo específico para una etiqueta péptido fusionada con la BM, y el análisis de transferencia northern. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede ligarse operativamente a un gen informador; los niveles de expresión de una ABM dada a conocer en la presente memoria se determinan mediante la medición de una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen informador. El gen informador puede transcribirse conjuntamente con el ácido o ácidos nucleicos codificantes de dicha ABM en forma de una única molécula de ARNm; sus secuencias codificantes respectivas pueden ligarse mediante un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) o mediante un intensificador de traducción independiente de caperuza (CITE). El gen informador puede traducirse conjuntamente con por lo

menos un ácido nucleico codificante de una ABM dada a conocer en la presente memoria, de manera que se forma una única cadena polipeptídica. Los ácidos nucleicos codificantes de una ABM de la presente invención pueden ligarse operablemente al gen informador bajo el control de un único promotor, de manera que el ácido nucleico codificante de la ABM y el gen informador se transcriben en una molécula de ARN que se procesa alternativamente formando dos moléculas separadas de ARN mensajero (ARNm); uno de los ARNm resultantes se traduce en dicha proteína informadora, y la otra se traduce en la ABM.

- [0112] Pueden utilizarse métodos que son bien conocidos del experto en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una ABM que se une al mismo epítopo que el del anticuerpo PR1A3 murino conjuntamente con las señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Entre dichos métodos se incluyen las técnicas *in vitro* de ADN recombinante, las técnicas sintéticas y la recombinación *in vivo*/recombinación genética (ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989, y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1989.
- [0113] Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión-huésped para expresar la secuencia codificante de las ABMs de la presente invención. Preferentemente se utilizan células de mamífero como sistemas de células huésped transfectados con vectores de expresión plásmido de ADN recombinante o cósmido de ADN que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante del polipéptido de fusión. Más preferentemente, se utilizan células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto, o células vegetales como sistema celular huésped. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y de métodos de selección se describen en las referencias siguientes y referencias citadas en las mismas: Borth *et al.*, *Biotechnol. Bioen.* 71(4):266-73, 2000-2001, en: Werner *et al.*, *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80, 1998, en: Andersen and Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123, 2002, en: Chadd

and Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001), y en Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454, 2001.

- [0114] En realizaciones alternativas, pueden utilizarse otros sistemas celulares huésped eucarióticos, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen la secuencia codificante de una ABM de la presente invención, tal como los sistemas de expresión que se enseñan en la solicitud de patente US nº 60/344.169 y patente WO nº 03/056914 (métodos para producción glucoproteína de tipo humano en una célula huésped eucariótica no humana) (en contenido de cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad); sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo baculovirus) que contienen la secuencia codificante de una ABM que se une al mismo epítipo que el del anticuerpo PR1A3 murino o que es capaz de competir con PR1A3 para la unión de los antígenos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plásmido recombinante (por ejemplo plásmido Ti) que contienen la secuencia codificante de la ABM de la invención, incluyendo, aunque sin limitación, los sistemas de expresión enseñados en la patente US nº 6.815.184 (métodos para la expresión y secreción de polipéptidos biológicamente activos a partir de lenteja de agua genéticamente manipulada); patente WO nº 2004/057002 (producción de proteínas glucosiladas en células vegetales de briófito mediante la introducción de un gen de glucosiltransferasa) y patente WO nº 2004/024927 (métodos de generación de proteínas no vegetales heterólogas extracelulares en protoplasto de musgo) y solicitudes de patente US nº 60/365.769, nº 60/368.047 y patente WO nº 2003/078614 (procesamiento de glucoproteínas en plantas transgénicas que comprende un enzima GnTIII de mamífero funcional) (el contenido de cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad) o sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo adenovirus, virus vaccinia), incluyendo líneas celulares manipuladas para que contengan múltiples copias del ADN codificante de una ABM quimérica que se une al mismo epítipo que el anticuerpo PR1A3 murino establemente amplificado (CHO/dhfr) o inestablemente amplificado en cromosomas

dobles diminutos (por ejemplo líneas celulares murinas). En una realización, el vector que comprende el polinucleótido o polinucleótidos codificantes de la ABM de la invención es policistrónico. Además, en una realización, la AMB comentada anteriormente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización preferente, la ABM es un anticuerpo de afinidad madurada.

[0115] La expresión estable resulta generalmente preferente respecto a la expresión transitoria debido a que típicamente consigue resultados más reproducibles y también permite más fácilmente la producción a gran escala; sin embargo, se encuentra comprendido dentro de los conocimientos del experto en la materia determinar si la expresión transitoria resulta mejor para una situación particular. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, pueden transformarse células huésped con los ácidos nucleicos codificantes respectivos controlados por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo secuencias de promotor y de intensificador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción de ADN foráneo, puede permitirse el crecimiento de las células manipuladas durante 1 a 2 días en un medio enriquecido, y después se transfieren a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante proporciona resistencia a la selección y permite la selección de células que presentan establemente integrado el plásmido en sus cromosomas y crecen formando focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

[0116] Pueden utilizarse varios sistemas de selección, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los genes timidina quinasa (Wigler *et al.*, Cell 11:223, 1977), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026, 1962) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22:817, 1980) del virus herpes simplex, que pueden utilizarse en células tk⁻, hgp⁺ o apr⁺, respectivamente. Además, puede utilizarse la resistencia a un antimetabolito como base para la selección para dhfr, que proporciona resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567, 1989; O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981); gpt, que proporciona resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072, 1981); neo, que proporciona resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1, 1981); e hyg⁺, que proporciona resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, Gene

30:147, 1984). Recientemente, se han descrito genes seleccionables adicionales, es decir *trpB*, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; *hisD*, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047, 1988); el sistema de la glutamina sintasa; y ODC (ornitina descarboxilasa), que proporciona resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, la 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, editor, 1987).

[0117] La presente invención se refiere además a un método para modificar el perfil de glucosilación de las ABMs de la presente invención que son producidas por una célula huésped, que comprende expresar en dicha célula huésped un ácido nucleico codificante de una ABM de la invención y un ácido nucleico codificante de un polipéptido con una actividad de glucosiltransferasa, o un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. Entre los genes con actividad de glucosiltransferasa se incluyen $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTII), α -manosidasa II (ManII), $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (GalT), $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI), y $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII). En una realización, se expresa una combinación de genes con actividad de glucosiltransferasa en la célula huésped (por ejemplo GnTIII y ManII). De manera similar, el método también comprende la expresión de uno o más polinucleótidos codificantes de la ABM en una célula huésped en la que se ha interrumpido o desactivado de otro modo un gen de glucosiltransferasa (por ejemplo una célula huésped en la que se ha eliminado la actividad del gen codificante de $\alpha 1$ -6-fucosiltransferasa nuclear. En otra realización, las ABMs de la presente invención pueden producirse en una célula huésped que expresa además un polinucleótido codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII para modificar el patrón de glucosilación. En una realización específica, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en el Golgi. En otra realización preferente, la expresión de las ABMs de la presente invención en una célula huésped que expresa un polinucleótido codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII resulta en ABMs con afinidad de unión a receptor de Fc incrementada y una función efectora incrementada. Por consiguiente, en una realización, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende: (a) un ácido nucleico aislado que

comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII, y (b) un polinucleótido aislado codificante de una ABM de la presente invención, tal como un anticuerpo primatizado o humanizado quimérico que se une a CEA humano. En una realización preferente, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II. Los métodos para generar dichos polipéptidos de fusión y para utilizarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras incrementadas se dan a conocer en la solicitud provisional de patente US nº 60/495.142 y en la solicitud publicada de patente US nº 2004/0241817, el contenido completo de las cuales se incorpora expresamente en la presente memoria como referencia. En una realización particular, la ABM modificada producida por la célula huésped presenta una región constante de IgG o un fragmento de la misma que comprende la región Fc. En otra realización particular, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende una región Fc.

- [0118] Las ABMs con glucosilación alterada producidas por las células huésped de la invención típicamente muestran una afinidad de unión incrementada con el receptor de Fc y/o una función efectora incrementada, como resultado de la modificación de la célula huésped (por ejemplo mediante la expresión de un gen de glucosiltransferasa). Preferentemente, la afinidad de unión incrementada del receptor de Fc se la unión incrementada a un receptor activador de Fcγ, tal como el receptor de FcγRIIIa. La función efectora incrementada preferentemente es un incremento de uno o más de los siguientes: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) incrementada, incorporación de antígenos mediada por complejo inmunológico incrementada por parte de células presentadoras de antígeno, citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a células polimorfonucleares (PMNs), unión incrementada a monocitos, entrecruzamiento incrementado de anticuerpos unidos a diana, señalización directa incrementada inductora de apoptosis, maduración de células dendríticas incrementada y sensibilización incrementada de las células T.

Generación y utilización de ABMs que presentan una función efectora incrementada, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

[0119] En un aspecto, la presente invención proporciona glucoformas de ABMs (por ejemplo ABMs variantes) que se unen al mismo epítipo que el del anticuerpo PR1A3 murino y que presentan una función efectora incrementada, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La manipulación por glucosilación de los anticuerpos ha sido descrita anteriormente (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.602.684, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad). Los métodos para producir ABMs a partir de células huésped que presentan una actividad alterada de los genes implicados en la glucosilación también se describen en la presente memoria en detalle (ver, por ejemplo, la sección anterior titulada "Vectores de expresión y células huésped"). Los incrementos de la ADCC en las ABMs de la presente invención también se consiguen incrementando la afinidad de la molécula de unión a antígeno para el CEA unido a membrana, por ejemplo mediante maduración de la afinidad u otros métodos para mejorar la afinidad (ver Tang *et al.*, J. Immunol. 179:2815-2823, 2007). Las combinaciones de dichos enfoques también se encuentran comprendidas en la presente invención.

[0120] Los ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales no conjugados (mAbs) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer recientemente han proporcionado resultados prometedores. Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25, 1997; Deo *et al.*, Immunology Today 18:127, 1997. Una IgG1 no conjugada quimérica ha sido aprobada para el linfoma no Hodgkin de células F folicular o de grado bajo. Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25, 1997, mientras que otro mAb no conjugado, una IgG humanizada con diana en tumores sólidos de mama, también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III. Deo *et al.*, Immunology Today 18:127, 1997. Los antígenos de dichos dos mAbs se expresan a nivel elevado en sus células tumorales respectivas y los anticuerpos median en una destrucción tumoral potente por parte de células efectoras *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario, muchos otros mAbs no conjugados con especificidades tumorales finas no pueden inducir funciones efectoras de suficiente potencia para resultar clínicamente útiles. Frost *et al.*, Cancer 80:317-33, 1997; Surfus *et al.*, J. Immunother. 19:184-91, 1996. Para algunos de dichos mAbs más débiles, en la actualidad se está sometiendo a ensayo la terapia complementaria

con citoquinas. La adición de citoquinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante el incremento de la actividad y número de linfocitos circulantes. Frost *et al.*, Cancer 80:317-33, 1997; Surfus *et al.*, J. Immunother. 19:184-91, 1996. La ADCC, un ataque lítico sobre las células diana, resulta inducida por la unión de los receptores de leucocitos a la región constante (Fc) de los anticuerpos. Deo *et al.*, Immunology Today 18:127, 1997.

- [0121] Un enfoque diferente, aunque complementario, del incremento de la actividad de ADCC de las IgG1s no conjugadas es manipular la región Fc del anticuerpo. Los estudios de manipulación de proteínas han demostrado que los FcγRs interactúan con la región bisagra inferior del dominio CH2 de IgG. Lund *et al.*, J. Immunol. 157:4963-69, 1996. Sin embargo, la unión de FcγR también requiere la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente al aminoácido conservado Asn297 en la región CH2. Lund *et al.*, J. Immunol. 157:4963-69, 1996; Wright y Morrison, Trends Biotech. 15:26-31, 1997, sugiriendo que el oligosacárido y el polipéptido contribuyen ambos directamente al sitio de interacción, o que el oligosacárido resulta necesario para mantener una conformación del polipéptido con CH2 activo. Por lo tanto, la modificación de la estructura del oligosacárido puede explorarse como medio para incrementar la afinidad de la interacción.

- [0122] Una molécula de IgG incluye dos oligosacáridos N-ligados en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Al igual que cualquier glucoproteína, se produce un anticuerpo como población de glucoformas que comparten el mismo esqueleto polipeptídico pero que presentan diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glucosilación. Los oligosacáridos normalmente observados en la región Fc de la IgG sérica son de tipo biantenarico complejo (Wormald *et al.*, Biochemistry 36:130-38, 1997), con un nivel reducido de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina (GlcNAc) biantenaria y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación nuclear. Algunos estudios sugieren que la estructura mínima de carbohidrato necesaria para la unión de FcγR se encuentra dentro del núcleo oligosacárido (Lund *et al.*, J. Immunol. 157:4963-69, 1996).

- [0123] Las líneas celulares derivadas del ratón o del hámster utilizadas en la industria y en la universidad para la producción de mAbs terapéuticos no conjugados normalmente ligan los determinantes oligosacáridos necesarios a los sitios Fc. Las IgGs expresadas en dichas líneas celulares carecen, sin embargo,

del GlcNac biantenarío observado en cantidades reducidas en las IgGs séricas (Lifely *et al.*, Glycobiology 318:813-22, 1995). Por el contrario, recientemente se ha observado que una IgG1 humanizada producida por mieloma de rata (CAMPATH-1H) incluía un GINAc biantenarío en algunas de sus glucoformas. (Lifely *et al.*, Glycobiology 318:813-22, 1995). El anticuerpo derivado de células de rata alcanzaba una actividad de ADCC máxima *in vitro* similar a la de los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares estándares, aunque a concentraciones de anticuerpo significativamente más bajas.

- [0124] El antígeno CAMPATH normalmente se encuentra presente a niveles elevados en las células de linfoma, y este mAb quimérico presenta una actividad de ADCC elevada en ausencia de un GlcNac biantenarío. (Lifely *et al.*, Glycobiology 318:813-22, 1995). En la ruta de glucosilación N-ligada, GnTIII añade un GlcNac biantenarío (Schachter, Biochem. Cell Biol. 64:163-81, 1986).
- [0125] Los estudios anteriores utilizaron una única línea celular CHO productora de anticuerpos que había sido previamente manipulada para expresar, de un modo externamente regulado, niveles diferentes de un gen de enzima GnTIII clonado (Umaña P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999). Este enfoque estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de una glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) y la actividad de ADCC del anticuerpo modificado. De esta manera, la invención contempla una ABM variante (por ejemplo una ABM de afinidad madurada) que se une al mismo epítipo que el del anticuerpo PR1A3 murino, que comprende una región Fc o una región equivalente a una región Fc que presenta una glucosilación alterada resultante de modificar el nivel de expresión de un gen de glucosiltransferasa en la célula huésped productora de ABM. En una realización específica, el cambio del nivel de expresión génica es un incremento de la actividad de GnTIII. La actividad de GnTIII incrementada resulta en un incremento del porcentaje de oligosacáridos biantenarios, así como en una reducción del porcentaje de residuos de fucosa en la región Fc de la ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, presenta una afinidad de unión incrementada del receptor de Fc y una función efectora incrementada.
- [0126] La presente invención se refiere además a un método para producir una ABM de la presente invención que presenta oligosacáridos modificados, que comprende (a) cultivar una célula huésped manipulada para expresar por lo menos un ácido

nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa bajo condiciones que permiten la producción de una ABM según la presente invención, en la que dicho polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa se expresa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicha ABM producida por dicha célula huésped, y (b) aislar dicha ABM. En una realización, el polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa es GnTIII. En otra realización, existen dos polipéptidos que presentan actividad de glucosiltransferasa. En una realización particular, los dos péptidos que presentan actividad de glucosiltransferasa son GnTIII y ManII. En otra realización, el polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En una realización más específica, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en el Golgi. Preferentemente, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II o de GnTI. Alternativamente, el dominio de localización en Golgi se selecciona de entre el grupo que consiste de: el dominio de localización de la manosidasa I, el dominio de localización de GnTII, y el dominio de localización de la α 1-6-fucosiltransferasa nuclear. Las ABMs producidas mediante los métodos de la presente invención presentan una afinidad de unión al receptor de Fc incrementada y/o una función efectora incrementada. Generalmente, la función efectora incrementada es una o más de los siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada (incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos incrementada (ADCP), secreción incrementada de citoquinas, incorporación de antígenos mediada por complejo inmunológico incrementada por parte de células presentadoras de antígenos, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a monocitos, unión incrementada a células polimorfonucleares, señalización directa inductora de apoptosis incrementada, entrecruzamiento incrementado de anticuerpos unidos a diana, maduración incrementada de las células dendríticas o sensibilización incrementada de las células T. La afinidad de unión de receptor de Fc incrementada preferentemente es la unión incrementada a receptores activadores de Fc, tales como Fc γ RIIIa. En una realización particularmente preferente, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

En una realización, el porcentaje de oligosacáridos N-ligados biantenarios en la región Fc de la ABM es por lo menos entre aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, específicamente por lo menos aproximadamente 50%, más específicamente, entre por lo menos aproximadamente 60% y por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, o por lo menos aproximadamente 90% a 95% del total de oligosacáridos. En todavía otra realización, la molécula de unión a antígeno producida por los métodos de la invención presenta una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos de la presente invención. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es de entre por lo menos aproximadamente 20% y aproximadamente 100%, específicamente de por lo menos aproximadamente 50%, de entre por lo menos aproximadamente 60% y aproximadamente 70%, y más específicamente, de por lo menos aproximadamente 75%. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser del tipo híbrido o complejo. En todavía otra realización, la molécula de unión a antígeno producida mediante los métodos de la invención presenta una proporción incrementada de oligosacáridos biantenarios en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos de la presente invención. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos biantenarios es de entre por lo menos aproximadamente 20% y aproximadamente 100%, específicamente de por lo menos aproximadamente 50%, de entre por lo menos aproximadamente 60% y aproximadamente 70%, y más específicamente de por lo menos aproximadamente 75%. En una realización particularmente preferente, la ABM producida utilizando las células huésped y los métodos de la invención presenta una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados biantenarios en la región Fc. Los oligosacáridos no fucosilados biantenarios puede ser híbridos o complejos. Específicamente, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para producir moléculas de unión a antígeno en las que entre por lo menos aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, específicamente por lo menos aproximadamente 15%, más específicamente entre por lo menos 20% y aproximadamente 50%, más específicamente entre por lo menos aproximadamente 20% y aproximadamente 25%, y más específicamente entre por lo menos aproximadamente 30% y aproximadamente 35% de los oligosacáridos en la región

Fc de la molécula de unión a antígeno son biantenarios no fucosilados. Las ABMs de la presente invención también pueden comprender una región Fc en la que entre por lo menos aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, específicamente por lo menos aproximadamente 15%, más específicamente entre por lo menos aproximadamente 20% y aproximadamente 25%, y más específicamente entre por lo menos aproximadamente 30% y aproximadamente 35% de los oligosacáridos en la región Fc de la ABM son biantenarios híbridos no fucosilados.

[0127]

[0128] En otra realización, la presente invención se refiere a una molécula de unión a antígeno (por ejemplo una ABM variante) capaz de competir con el anticuerpo PR1A3 para el CEA humano unido a membrana que se manipula para que presente una función efectora incrementada y/o una afinidad de unión a receptor de Fc incrementada, producida mediante los métodos de la invención. La función efectora incrementada puede incluir, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada (incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos incrementada (ADCP), secreción incrementada de citoquinas, incorporación de antígenos mediada por complejo inmunológico incrementada por parte de células presentadoras de antígenos, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a monocitos, unión incrementada a células polimorfonucleares, señalización directa inductora de apoptosis incrementada, entrecruzamiento incrementado de anticuerpos unidos a diana, maduración incrementada de las células dendríticas o sensibilización incrementada de las células T. En una realización preferente, la afinidad de unión de receptor de Fc incrementada es la unión incrementada a un receptor activador de Fc, más preferentemente FcγRIIIa. En una realización, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización particularmente preferente, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo humanizado de afinidad madurada.

[0129] La presente invención proporciona además métodos para la generación y utilización de sistemas de células huésped para la producción de glucoformas de las ABMs de la presente invención, que presentan una afinidad de unión a receptor de

Fc incrementada, preferentemente una unión incrementada a receptores activadores de Fc, y/o que presentan funciones efectoras incrementadas, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La metodología de glucomanipulación que puede utilizarse con las ABMs de la presente invención ha sido descrita en mayor detalle en la patente US nº 6.602.684, en la solicitud publicada de patente US nº 2004/0241817 A1, en la solicitud publicada de patente US nº 2003/0175884 A1, en la solicitud provisional de patente US nº 60/441.307 y en la patente WO nº 2004/065540, el contenido completo de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Las ABMs de la presente invención alternativamente pueden glucomanipularse para presentar un número reducido de residuos de fucosa en la región Fc según las técnicas dadas a conocer en la solicitud publicada de patente US nº 2003/0157108 (Genentech), o en el documento EP nº 1.176.195 A1, o en las patentes WO nº 03/084570, WO nº 03/085119 y en las solicitudes publicadas de patente US nº 2003/0115614, nº 2004/093621, nº 2004/110282, nº 2004/110704, nº 2004/132140 (Kyowa). El contenido de cada uno de dichos documentos se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Las ABMs glucomanipuladas de la invención también pueden producirse en sistemas de expresión que producen glucoproteínas modificadas, tales como las enseñadas en la solicitud publicada de patente US nº 60/344.169 y en la patente WO nº 03/056914 (GlycoFi, Inc.) o en las patentes WO nº 2004/057002 y nº 2004/024927 (Greenovation), el contenido de cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria en su totalidad.

Generación de líneas celulares para la producción de proteínas con un patrón de glucosilación alterado

[0130] En un aspecto, la presente invención proporciona sistemas de expresión de células huésped para la generación de las ABMs de la presente invención que presentan patrones de glucosilación modificados. En particular, la presente invención proporciona sistemas de células huésped para la generación de glucoformas de las ABMs de la presente invención que presentan un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la invención proporciona sistemas de expresión de células huésped seleccionadas o manipuladas para expresar un polipéptido que presenta una actividad de glucosiltransferasa. En una realización específica, la

actividad de glucosiltransferasa es una actividad de GnTIII. En una realización, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. Específicamente, dichos sistemas de expresión de célula huésped pueden manipularse para que comprendan una molécula de ácido nucleico recombinante codificante de un polipéptido que presenta GnTIII operablemente ligado a un sistema promotor constitutivo o regulado.

[0131] En una realización específica, la presente invención proporciona una célula huésped que ha sido manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido de fusión que presenta actividad de GnTIII y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En un aspecto, la célula huésped se manipula con una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos un gen codificante de un polipéptido de fusión que presenta actividad de GnTIII y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

[0132] Generalmente, puede utilizarse cualquier tipo de línea celular en cultivo, incluyendo las líneas celulares comentadas anteriormente, como fondo para manipular las líneas celulares huésped de la presente invención. En una realización preferente, se utilizan células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales, como la línea celular de fondo para generar las células huésped manipuladas de la invención.

[0133] La invención se contempla que comprenda cualquier célula huésped manipulada que expresa un polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII, incluyendo un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo tal como se define en la presente memoria.

[0134] Puede expresarse uno o varios ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII, bajo el control de un promotor constitutivo, o alternativamente, un sistema de expresión regulado. Dichos sistemas son bien conocidos de la técnica, e incluyen los sistemas comentados anteriormente. En el caso de que varios ácidos nucleicos

diferentes codificantes de polipéptidos de fusión que presentan actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII, y que comprendan el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo se encuentre comprendidos dentro del sistema celular huésped, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que presentan actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII, se determinan mediante métodos generalmente conocidos de la técnica, incluyendo el análisis de transferencia western, el análisis de transferencia northern, el análisis de expresión de gen informador o la medición de la actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo la actividad de GnTIII. Alternativamente, puede utilizarse una lectina que se une a productos biosintéticos del GnTIII, por ejemplo la lectina de E₄-PHA. Alternativamente, puede utilizarse un ensayo funcional que mide la unión incrementada de receptor de Fc o la función efectora incrementada mediada por anticuerpos producidos por las células manipuladas con el ácido nucleico codificante de un polipéptido con actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII.

Identificación de transfectantes o transformantes que expresan la proteína que presenta un patrón de glucosilación modificado

- [0135] Las células huésped que contienen la secuencia codificante de una ABM variante (por ejemplo una ABM humanizada de afinidad madurada) que es capaz de competir con el anticuerpo PR1A3 para la unión a antígeno y que expresa los productos génicos biológicamente activos pueden identificarse mediante por lo menos cuatro enfoques generales: (a) la hibridación ADN-ADN o ADN-ARN, (b) la presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras", (c) la evaluación del nivel de transcripción según medición de la expresión de los transcritos de ARNm respectivos en la célula huésped, y (d) detección del producto génico según medición mediante inmunoensayo o a partir de su actividad biológica.
- [0136] En el primer enfoque, la presencia de la secuencia codificante de una ABM variante que es capaz de competir con el anticuerpo PR1A3 y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) puede detectarse mediante hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN utilizando

sondas que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a las secuencias codificantes respectivas, respectivamente, o partes o derivados de las mismas.

[0137] En el segundo enfoque, el vector de expresión recombinante/sistema huésped puede identificarse y seleccionarse basado en la presencia o ausencia de determinadas funciones génicas "marcadoras" (por ejemplo actividad de timidina quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia al metotrexato, fenotipo transformado, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, en el caso de que la secuencia codificante de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII), se inserte dentro de una secuencia génica marcadora del vector, los recombinantes que contengan las secuencias codificantes respectivas pueden identificarse a partir de la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, puede situarse un gen marcador en tándem con las secuencias codificantes bajo el control del mismo promotor o un promotor diferente utilizado para controlar la expresión de las secuencias codificantes. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia codificante de la ABM de la invención y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII).

[0138] En el tercer enfoque, la actividad transcripcional de la región codificante de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) puede evaluarse mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, puede aislarse ARN y analizarse mediante transferencia northern utilizando una sonda homóloga a las secuencias codificantes de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) o partes particulares de la misma. Alternativamente, pueden extraerse el total de ácidos nucleicos de la célula huésped y someterse a ensayo para la hibridación a dichas sondas.

[0139] En el cuarto enfoque, la expresión de los productos proteicos puede evaluarse inmunológicamente, por ejemplo mediante transferencias western, inmunoensayos tales como la radioinmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a

enzima y similares. El ensayo final del éxito del sistema de expresión, sin embargo, implica la detección de los productos génicos biológicamente activos.

Aplicaciones terapéuticas y métodos de utilización de anti-CEA de moléculas de unión a antígeno

[0140] La invención se refiere además a un método para dirigir células *in vivo* o *in vitro* que expresan CEA. Las células que expresan CEA pueden dirigirse con fines terapéuticos (por ejemplo para tratar un trastorno mediante la dirección de las células que expresan CEA para la destrucción por parte del sistema inmunológico). En una realización, la presente invención se refiere a un método para dirigir células que expresan CEA en un sujeto, que comprende administrar en el sujeto una composición que comprende una ABM de la invención. Las células que expresan CEA también pueden dirigirse con fines diagnósticos (por ejemplo para determinar si expresan CEA, normal o anormalmente). De esta manera, la invención se refiere además a métodos para detectar la presencia de CEA o de una célula que expresa CEA, *in vivo* o *in vitro*. Un método para detectar la expresión de CEA según la presente invención comprende poner en contacto una muestra que debe someterse a ensayo, opcionalmente con una muestra de control, con una ABM de la presente invención, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre la ABM y CEA. A continuación, se detecta la formación de complejo (por ejemplo mediante ELISA u otros métodos conocidos de la técnica). Al utilizar una muestra de control con la muestra de ensayo, cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos de ABM-CEA al comparar las muestras de ensayo y de control es indicativa de la presencia de CEA en la muestra de ensayo.

[0141] En un aspecto, las ABMs de la presente invención pueden utilizarse para dirigirse *in vivo* o *in vitro* a células que expresan CEA. Las células que expresan CEA pueden ser dianas con fines diagnósticos o terapéuticos. En un aspecto, las ABMs de la presente invención pueden utilizarse para detectar la presencia de CEA en una muestra. CEA se expresa anormalmente (por ejemplo se sobreexpresa) en muchos tumores humanos en comparación con tejido no tumoral del mismo tipo celular. De esta manera, las ABMs de la invención resultan particularmente útiles en la prevención de la formación de tumores, en la erradicación de tumores y en la inhibición del crecimiento tumoral o la metástasis. Las ABMs de la invención

también actúan deteniendo el ciclo celular, provocando la apoptosis de las células diana (por ejemplo células tumorales) e inhibiendo la angiogénesis y/o la diferenciación de las células diana. Las ABMs de la invención pueden utilizarse para tratar cualquier tumor que exprese CEA. Entre los tumores malignos particulares que pueden tratarse con las ABMs de la invención se incluyen, aunque sin limitación, el cáncer colorrectal, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el cáncer gástrico, el cáncer pancreático y el cáncer de mama.

[0142] Las ABMs anti-CEA dadas a conocer en la presente memoria pueden utilizarse solas para inhibir el crecimiento tumoral o para eliminar las células tumorales. Por ejemplo, las ABMs anti-CEA pueden unirse a CEA que se encuentra sobre la membrana o superficie celular de las células cancerosas e inducir, por ejemplo, la ADCC u otra eliminación mediada por efector de las células cancerosas. Las ABMs anti-CEA pueden encontrarse humanizadas, específicamente, de afinidad madurada, más específicamente, glucomanipuladas y de afinidad madurada.

[0143] Las ABMs alternativamente pueden utilizarse solas con el fin de bloquear la actividad del antígeno CEA, particularmente mediante la interferencia física con su unión a otro compuesto. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno pueden utilizarse para bloquear la adhesión celular mediada por CEA.

[0144] Las ABMs anti-CEA de la invención se administran en un mamífero, preferentemente en un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las comentadas posteriormente, incluyendo aquéllas que pueden administrarse en un ser humano intravenosamente en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o mediante inhalación. Las ABMs también se administran convenientemente mediante las vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos. La vía intraperitoneal se espera que resulte particularmente útil, por ejemplo en el tratamiento de los tumores colorrectales.

[0145] Para el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada de ABM dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, de la severidad y curso de la enfermedad, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la

respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico responsable. La ABM se administra convenientemente en el paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

[0146] La presente invención proporciona un método para eliminar selectivamente las células tumorales que expresan CEA. Dicho método comprende hacer reaccionar las moléculas de unión a antígeno o los conjugados (por ejemplo la inmunotoxina) de la invención con dichas células tumorales. Estas células tumorales pueden proceder de un carcinoma humano, incluyendo un carcinoma colorrectal, un carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), un carcinoma gástrico, un carcinoma pancreático y un carcinoma de mama.

[0147] En una realización, la presente invención proporciona un método para inhibir la adhesión celular mediada por CEA de una célula tumoral. Dicho método comprende poner en contacto dicha célula tumoral con las moléculas de unión a antígeno o los conjugados de la invención. Dichas células tumorales pueden ser de células humanas, incluyendo células de cáncer colorrectal, células de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), células de cáncer gástrico, células de cáncer pancreático y células de cáncer de mama.

[0148] Además, la presente invención proporciona un método para tratar los carcinomas (por ejemplo los carcinomas humanos) *in vivo*. Dicho método comprende administrar en un sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que contiene por lo menos una de las moléculas de unión a antígeno o los inmunconjugados (por ejemplo la inmunotoxina) de la invención.

[0149] En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar cánceres caracterizados por la sobreexpresión de CEA, incluyendo, aunque sin limitación, células de cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), células de cáncer gástrico, células de cáncer pancreático y células de cáncer de mama, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno humanizadas o de afinidad madurada o moléculas de unión a antígeno variantes dadas a conocer en la presente memoria.

[0150] En una realización adicional, la invención se refiere a un método para inducir la regresión del tejido tumoral en un sujeto utilizando las moléculas de unión a antígeno humanizadas y de afinidad madurada o moléculas de unión a antígeno

variantes dadas a conocer en la presente memoria. Entre los ejemplos no limitativos del tejido tumoral se incluyen tumor colorrectal, tumor pulmonar de células no pequeñas, tumor gástrico, tumor pancreático y tumor de mama. En una realización particular, el tejido tumoral es un tumor colorrectal.

[0151] Según la práctica de la presente invención, el sujeto puede ser un sujeto humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino y aviar. Otros animales de sangre caliente también se encuentran comprendidos en la presente invención.

[0152] La invención proporciona además métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales, para tratar un tumor en un sujeto y para tratar una enfermedad de tipo proliferativo en un sujeto. Dichos métodos comprenden la administración en el sujeto una cantidad eficaz de la composición de la invención.

[0153] En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de las moléculas de unión a antígeno humanizadas y de afinidad madurada o moléculas de unión a antígeno variantes dadas a conocer en la presente memoria para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad relacionada con la expresión anormal de CEA. En una realización particular, la enfermedad es un cáncer que sobreexpresa CEA, incluyendo, aunque sin limitación, tumor colorrectal, tumor pulmonar de células no pequeñas, tumor gástrico, tumor pancreático y tumor de mama. En una realización particular, el tumor es un tumor colorrectal.

Composiciones, formulaciones, dosis y vías de administración

[0154] En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las ABMs de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención se refiere además a la utilización de dichas composiciones farmacéuticas en el método de tratamiento de enfermedades, tales como cáncer, o en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad, tal como cáncer. Específicamente, la presente invención se refiere a un método destinado al tratamiento de enfermedades, y más particularmente, destinado al tratamiento de cáncer, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la invención.

[0155] En un aspecto, la presente invención comprende composiciones farmacéuticas, combinaciones y métodos para tratar carcinomas humanos, por

ejemplo el carcinoma colorrectal. Por ejemplo, la invención incluye composiciones farmacéuticas para la utilización en el tratamiento de carcinomas humanos, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0156] Las composiciones de ABM de la invención pueden administrarse utilizando modos convencionales de administración, incluyendo, aunque sin limitación, la administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o directamente en el tumor. Resulta preferente la administración intravenosa.

[0157] En un aspecto de la invención, se preparan formulaciones terapéuticas que contienen las ABMs de la invención para el almacenamiento mediante la mezcla de un anticuerpo que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas.

[0158] Las formulaciones que deben utilizarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Lo anterior se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0159] El modo de administración y régimen de dosificación más eficaces para las composiciones farmacéuticas de la presente invención dependen de la severidad y curso de la enfermedad, de la salud del paciente y de la respuesta al tratamiento y del criterio del médico responsable. Por consiguiente, las dosis de las composiciones deben titularse para el paciente individual. Sin embargo, una dosis eficaz de las composiciones de la presente invención generalmente se encontrará comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 2.000 mg/kg.

[0160] Las moléculas indicadas en la presente memoria puede encontrarse en una diversidad de formas de dosificación, incluyendo, aunque sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas poliméricas o microvesículas, liposomas y soluciones inyectables o infusionables. La forma preferente depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

[0161] La composición que comprende una ABM de la presente invención se formula, dosifica y administra de un modo consistente con la buena práctica médica. Entre los factores que deben considerarse en el presente contexto se incluyen la enfermedad o trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular bajo tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa de la enfermedad o trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos para el médico. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista que debe administrarse encontrará gobernada por dichas consideraciones.

[0162] Los ejemplos a continuación explican la invención en mayor detalle. Las preparaciones y ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de permitir al experto en la materia comprender más claramente y poner en práctica la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada en su alcance por las realizaciones ejemplificadas, que pretenden ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención únicamente, y los métodos que son funcionalmente equivalentes se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención. En efecto, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en la presente memoria resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Dichas modificaciones pretenden encontrarse comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

[0163] A menos que se indique lo contrario, las referencias a la numeración de residuos aminoácidos específicos en los Ejemplos siguientes se proporcionan según el sistema de numeración de Kabat.

EJEMPLO 1

Generación de bibliotecas de maduración de la afinidad

Biblioteca H1/H2

[0164] Para la generación de una biblioteca de maduración de la afinidad aleatorizada en las regiones HCDR1 y HCDR2, se aleatorizaron los tripletes

codificantes de las posiciones F32 G33 en CDR1 y de las posiciones W50 N52 T52a K52b T54 E56 T58 en CDR2. En una primera etapa, se amplificó un fragmento de ADN (fragmento 1) utilizando pMS22 como molde y los cebadores MS-43 y EAB-679 que contiene las posiciones aleatorizadas de CDR1 (fig. 14 y Tabla 4). Utilizando el mismo molde, los cebadores MS-56 y MS-52 amplificaron un segundo fragmento (fragmento 2) que presenta una región solapante con el extremo 3' del fragmento 1. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación a 94°C de 5 minutos seguido de 25 ciclos, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 20 segundos y de 50 segundos a 72°C, respectivamente para los fragmentos 1 y 2. Se llevó a cabo al final una etapa final de incubación de 10 minutos a 72°C. Se purificaron ambos fragmentos en un gel de agarosa. Una PCR de extensión solapante con los fragmentos 1 y 2 utilizando los cebadores MS-43 y EAB-680, que incluían las posiciones aleatorizadas de CDR2, generó un fragmento con ambas CDRs aleatorizadas (fragmento 3). Para el ensamblaje de los fragmentos 1 y 2, se utilizaron cantidades equimolares de los fragmentos 1 y 2. Las condiciones de amplificación incluían una etapa de incubación inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 40 segundos a 72°C. Tras la adición de los cebadores externos, se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales utilizando los mismos parámetros. Un cuarto fragmento (fragmento 4) que se solapa con la región 3' del fragmento 3 se amplificó mediante PCR utilizando nuevamente pMS22 como molde y los cebadores MS-55 y MS-52. Tras la purificación en gel, una PCR final de extensión de solapamiento utilizando los fragmentos 3 y 4 como moldes y los cebadores MS-43 y MS-52 generó un fragmento que contenía CL y partes de VH. Para ello, se utilizaron cantidades equimolares de los fragmentos 3 y 4. Las condiciones de amplificación incluían una etapa de incubación inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 80 segundos a 72°C. Tras la adición de los cebadores externos, se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales utilizando los mismos parámetros. A continuación, el

fragmento resultante se purificó en gel y se ligó con pMS22 tras digestión con NcoI/NheI.

TABLA 6

Cebador	SEC ID nº	Secuencias de nucleótidos de cebadores de la biblioteca H1/H2
MS-43	123	CCAGCCGGCCATGGCCGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATC
MS-52	124	GAAGACCGATGGGCCTTTGGTGCTAG
MS-55	125	GCAACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGG
MS-56	126	ATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG
EAB-679	127	CAGGGGCCTGTCGCACCCAGTTCATMNNAWACTCAGTGAAGGTGTATCCAGAAGCC
EAB-680	128	CCGTCCCTTAAACTCTTCAACATAGGTTGCCTCTCCAGTTTGGTGTTTATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTC CAGG

Aleatorización de los cebadores EAB-679 y EAB-680.

Subrayados: 60% de base original y 40% de aleatorización como N

Biblioteca L1/L2

[0165] Para la generación de una biblioteca de maduración de la afinidad aleatorizada en las regiones LCDR1 y LCDR2, se aleatorizaron los tripletes codificantes de las posiciones Q27, N28, V29, G30, T31, N32 en CDR1 y las posiciones Y49, S50, Y53, R54, Y55, S56 en CDR2. En una primera etapa, se amplificó un fragmento de ADN (fragmento 1) utilizando pMS22 como molde y los cebadores EAB-685 y EAB-681 que contiene las posiciones aleatorizadas de CDR1 (fig. 12 y Tabla 6). Utilizando el mismo molde, los cebadores EAB-686 y EAB-687 amplificaron un segundo fragmento (fragmento 2) que presenta una región solapante con el extremo 3' del fragmento 1. Las condiciones de amplificación incluían una etapa de incubación inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72°C, para los fragmentos 1 y 2, respectivamente. Se llevó a cabo al final una etapa final de incubación de 10 minutos a 72°C. Se purificaron ambos fragmentos en un gel de agarosa. Una PCR de extensión solapante con los fragmentos 1 y 2 utilizando los cebadores EAB-685 y EAB-682, que incluían las posiciones aleatorizadas de CDR2, generó un fragmento con ambas CDRs aleatorizadas

(fragmento 3). Para el ensamblaje de los fragmentos 1 y 2, se utilizaron cantidades equimolares de los fragmentos 1 y 2. Las condiciones de amplificación incluían una etapa de incubación inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72°C. Tras la adición de los cebadores externos, se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales utilizando los mismos parámetros. Un cuarto fragmento (fragmento 4) que se solapa con la región 3' del fragmento 3 se amplificó mediante PCR utilizando nuevamente pMS22 como molde y los cebadores EAB-688 y EAB-687. Tras la purificación en gel, una PCR final de extensión de solapamiento utilizando los fragmentos 3 y 4 como moldes y los cebadores EAB-685 y EAB-687 generó un fragmento que contenía VL y partes de CL. Para ello, se utilizaron cantidades equimolares de los fragmentos 3 y 4. Las condiciones de amplificación incluían una etapa de incubación inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 80 segundos a 72°C. Tras la adición de los cebadores externos, se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales utilizando los mismos parámetros. A continuación, se ligó este fragmento con pMS22 tras la digestión con HindIII/SacI.

TABLA 7

Cebador	SEC ID nº	Secuencia de nucleótidos de cebadores de la biblioteca L1/L2
EAB-685	129	CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAA ATTCTATTTCAAGG
EAB-686	130	GTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGG
EAB-687	131	GCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCCCTGATGG
EAB-688	132	GGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGG
EAB-681	133	CCTGGTTTCTGCTGATACCACGCAACATTAGTACCC <u>ACATTCTGACTGGCCTTGCAAGTGATGGTGACTC</u>
EAB-682	134	CTGCCACTGAACCTTGATGGGACTCCACTGTAGCG <u>GTAGGATGCCGAATAGATCAGGAGCTTAGGTGCTT</u> TCCCTGG

Aleatorización de los cebadores EAB-681 y EAB-682.

Subrayado: 60% de base original y 40% de aleatorización como N

Bibliotecas H3

[0166] Para la generación de bibliotecas de maduración de afinidad aleatorizadas en la región HCDR3, se aleatorizaron los tripletes codificantes de las posiciones W95, D96, F97, Y98, D99, Y100, V100a, E100b, A100c y M100d siguiendo dos enfoques diferentes: (1) aleatorización del segmento completo (biblioteca completa de H3), o (2) aleatorización individual de cada posición, resultando en diez sub-bibliotecas. Las sub-bibliotecas que contenían clones con posiciones individualmente aleatorizadas se agruparon tras la transformación en bacterias (biblioteca agrupada H3). Para la aleatorización de la región HCDR3, los fragmentos se amplificaron mediante PCR utilizando un cebador que se hibridaba con el extremo 3' de CL y los cebadores que incluían las secuencias aleatorizadas de HCDR3 (fig. 13). A continuación, se llevó a cabo una PCR de extensión de solapamiento con un segundo fragmento que se solapaba con el extremo 3' del fragmento 1, y que comprendía el extremo de VH y la región 5' de CH1. Seguidamente, los fragmentos ensamblados se ligaron en pMS22 tras la digestión con *SacI/NheI*. Para la generación de la biblioteca agrupada H3, se amplificaron mediante PCR separadamente diez fragmentos de ADN utilizando cada uno de los cebadores AC7-AC16 en combinación con el cebador EAB-749. Para la generación de la biblioteca completa L3, se utilizaron los cebadores AC17 y EAB749. Se utilizó el plásmido pMS22 a modo de molde. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos, consistiendo cada uno de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 36 segundos a 72°C, seguido de una etapa de incubación final de 10 minutos a 72°C. Ello resultó en fragmentos de aproximadamente 580 pb de longitud que se purificaron en un gel de agarosa. Para la PCR de extensión de solapamiento, se amplificó un segundo fragmento utilizando el cebador EAB-750 o el cebador EAB-751 en combinación con EAB-752. Aunque el cebador EAB-750 presentaba una secuencia solapante con los cebadores de aleatorización AC7-11, EAB-75 compartía homologías de secuencia con los cebadores de aleatorización AC17-17. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94°C, seguida de 25 ciclos, consistiendo cada uno de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación

de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 12 segundos a 72°C, seguido de una etapa final de incubación de 10 minutos a 72°C. Los fragmentos resultantes presentaban una longitud aproximada de 180 pb. Para el ensamblaje de ambos fragmentos se utilizaron cantidades equimolares del fragmento 1 y el fragmento 2 correspondiente. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94°C, seguida de 5 ciclos sin cebadores, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72°C. Tras la adición de los cebadores exteriores EAB-749 y EAB-752, se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales utilizando los mismos parámetros. Finalmente, se llevó a cabo una etapa final de incubación de 10 minutos a 72°C. Seguidamente, los fragmentos purificados en gel se ligaron en pMS22 tras la digestión con *Sac/Nhe* y las ligaciones purificadas se transformaron en bacterias TG1 mediante electroporación.

TABLA 8

Cebador	SEC ID nº	Bibliotecas H3—Secuencia de nucleótidos de cebadores
AC7	135	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCATAGAAGTCMN NTCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC8	136	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCATAGAAAMNNCC ATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC9	137	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCATAMNNGTCCC ATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC10	138	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCMNNGAAGTCCC ATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC11	139	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAMNNATAGAAGTCCC ATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC12	140	CGTGGTCCCTTGCCCCAGTAGTCCATAGCCTCCACMN NATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC13	141	CGTGGTCCCTTGCCCCAGTAGTCCATAGCCTCMNNGT AATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC14	142	CGTGGTCCCTTGCCCCAGTAGTCCATAGCMNNCACG TAATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC15	143	CGTGGTCCCTTGCCCCAGTAGTCCATMNNCTCCACGT AATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC16	144	CGTGGTCCCTTGCCCCAGTAGTCMNNAGCCTCCACG TAATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC17	145	CGTGGTCCCTTGCCCCAGTAGTCCATAGCCTCCACGT AATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAGTAATACACGGCA G
EAB-749	146	CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC

EAB-750	147	CGTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGG
EAB-751	148	GACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC
EAB-752	149	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG

Aleatorización del cebador AC17:

En negrita y cursiva: 60% de base original y 40% de aleatorización como M

Subrayado: 60% de base original y 40% de aleatorización como N

Bibliotecas L3

[0167] Para la generación de bibliotecas de maduración de afinidad aleatorizadas en la región CDR3 de la cadena ligera, se aleatorizaron los tripletes codificantes de las posiciones Y91, Y92, T93, Y94 y L95a en todo el segmento (biblioteca completa de L3) o individualmente, resultando en cinco sub-bibliotecas. Las sub-bibliotecas que contenían clones con posiciones individualmente aleatorizadas se agruparon tras la transformación en bacterias (biblioteca agrupada L3). Para la generación de las cinco sub-bibliotecas, se amplificaron mediante PCR cinco fragmentos de ADN utilizando cada uno de los cebadores AC1 a AC5 en combinación con el cebador MS43. Para la generación de la biblioteca completa L3, se utilizó la combinación de cebadores AC6 y MS43 (fig. 14). Se utilizó el plásmido pMS22 como molde. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos, consistiendo cada ciclo de una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una hibridación de 1 minuto a 55°C y una etapa de alargamiento de 25 segundos a 72°C, seguido de una etapa final de incubación de 10 minutos a 72°C. Los fragmentos resultantes, que comprendían las posiciones 1 a 104 del dominio VL se purificaron en un gel de agarosa y se utilizaron como molde para una amplificación adicional mediante PCR. Todas las reacciones se llevaron a cabo con el cebador EAB-746, que presenta una secuencia solapante con los cebadores de aleatorización y MS43 bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente. Los fragmentos purificados, así como pMS22 se digirieron con NcoI/XhoI. Para todas las cinco sub-bibliotecas, se ligaron 0,5 µg de inserción con 0,5 µg de pAC16. Para la biblioteca completa L3, la ligación se llevó a cabo con 9,8 µg de inserción y 9,8 µg de pMS22. Las ligaciones purificadas se transformaron en bacterias TG1 mediante electroporación.

[0168]

TABLA 9

Cebador	SEC ID nº	Bibliotecas L3—Secuencia de nucleótidos de los cebadores
AC1	150	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAGGT GTAMNNTTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC2	151	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAGGT MNN ATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC3	152	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAMNN GTAATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC4	153	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGMNNGG TGTAATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC5	154	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAAMNNAGGATAGG TGTAATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC6	155	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAGGT GTAATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
EAB-746	156	CGCTTGATCTCGAGCTTGGTGCCCTGGCCAAAC GTG
MS-43	123	CCAGCCGGCCATGGCCGATATCCAGATGACCCA GTCTCCATC

Aleatorización del cebador AC6:

En negrita y cursiva: 60% de base original y 40% de aleatorización como M

Subrayado: 60% de base original y 40% de aleatorización como N

Generación de los antígenos

[0169] Debido a que los anticuerpos PR1A3 murino y humanizado reconocen únicamente el CEA humano soluble unido a membrana, y no el desprendido, se generó una proteína quimérica recombinante que contenía el epítipo de PR1A3 para la maduración *in vitro* de la afinidad de PR1A3 humanizado (SEC ID nº 7 y nº 8). La generación de dicha proteína híbrida se llevó a cabo tal como se describe en Steward *et al.*, 1999. Brevemente, se sustituyó la secuencia de ADN del dominio B de la glucoproteína biliar humana (BGP) por la secuencia del dominio B3 del CEA humano, que contiene el epítipo de PR1A3. Como resultado, la secuencia codifica una proteína híbrida que comprende los dominios N y A1 de BGP, el dominio B3 de CEA y el dominio A2 de BGP (N-A1-B3-A2, NABAh_u). Este producto de fusión seguidamente se unió a la parte Fc de la IgG1 humana (NABAh_u-Fc) (Steward *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-306, 1999) o se fusionó con una secuencia codificante del sitio de corte de la proteasa de precisión, una etiqueta avi y una etiqueta (His)6 (NABAh_u-avi-his) (SEC ID nº 158). Se purificó NABAh_u-Fc a partir del sobrenadante de una línea celular CHO establemente transfectada

utilizando una columna de proteína A. Se transfectó transitoriamente NABahu-avi-his en células HEK 293, expresando establemente la proteína EBNA derivada del EBV. Un plásmido cotransfectado simultáneamente codificante de una biotina ligasa permitió la biotinilación específica de la etiqueta avi *in vivo*. A continuación, se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) seguido de filtración en gel.

SEC ID nº 158 (NABahu-avi-his) pETR6592

```
QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPPQLFGYSWKGERVDG
NRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVQTNDT
GFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVPELPKPSISSNNSNPVED
KDAMAFTCEPETQDTTYLWWINNQLPVSRLQLSNGNRTL
TLLSVTRNDTGPECEIQNPVSANRSDPVTNLNTYGPDTPTIS
PPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLF
IAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSALSPVAKPQ
IKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFFKNQLPSSERM
KLSQGNITLSINPVKREDAGTYWCEVFNPISKNQSDPIMLNVN
YNALPQENLINVDLEVLFFQGPGLNDIFEAKIEWHEARAH
HHHHH
```

Maduración de la afinidad de PR1A3 humanizado

[0170] La generación de Fabs de PR1A3 humanizado de afinidad madurada se llevó a cabo mediante expresión fágica utilizando protocolos estándares (Silacci *et al.*, Proteomics 5(9):2340-2350, 2005). Las selecciones con todas las bibliotecas de maduración de afinidad se llevaron a cabo en solución siguiendo el procedimiento siguiente: 1. unión de $\sim 10^{12}$ partículas fagémicas de cada biblioteca de maduración de afinidad a 100 nM de NABahu-avi-his biotinilado durante 0,5 horas en un volumen total de 1 ml, 2. captura de NABahu-avi-his biotinilado y partículas fágicas unidas específicamente mediante la adición de $5,4 \times 10^7$ perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina durante 10 minutos, 3. lavado de las perlas utilizando 5-10x 1 ml de PBS/Tween-20 y 5-10x de 1 ml de PBS, 4. elución de partículas fágicas mediante la adición de 1 ml de TEA 100 mM (triethylamina) durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 μ l de Tris 1M/HCl, pH 7,4, y 5. reinfección de bacterias *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial, infección con el fago ayudante VCSM13 y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas fagémicas a utilizar en rondas de selección posteriores. Se llevaron a cabo las selecciones en 3 a 5 rondas utilizando concentraciones de antígeno constantes o

decrecientes (de 10^{-7} M a 2×10^{-9} M). En la ronda 2, la captura de los complejos de antígeno: fago se llevó a cabo utilizando placas con neutravidina en lugar de perlas con estreptavidina. Se identificaron los ligantes específicos mediante ELISA de la manera siguiente: se recubrieron placas de neutravidina con 100 μ l de NABahu-avi-his biotinilado 10 nM en cada pocillo. Se añadieron sobrenadantes bacterianos que contenían Fab y se detectaron las Fabs ligantes a partir de sus etiquetas Flag mediante la utilización de un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones positivos para ELISA se expresaron bacterianamente en forma de fragmentos Fab solubles en un formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se sometieron a un experimento de cribado cinético mediante análisis de SPR utilizando BIACORE T100. Los clones que expresaban Fabs con las constantes de afinidad más altas se identificaron y se secuenciaron los fagémidos correspondientes.

Purificación de Fabs y medición de los parámetros cinéticos

- [0171] Para el análisis exacto de los parámetros cinéticos, se purificaron los Fabs a partir de cultivos bacterianos. Se inoculó un cultivo de 500 ml y se indujo con IPTG 1 mM a una $DO_{600}=0,9$. Las bacterias se incubaron a 25°C durante la noche y se recolectaron mediante centrifugación. Tras la incubación del pellet resuspendido durante 20 minutos en 25 ml de tampón PPB (Tris-HCl 30 mM, pH 8, EDTA 1 mM, sacarosa al 20%), las bacterias se centrifugaron nuevamente y se recolectó el sobrenadante. Se repitió esta etapa de incubación una vez con 25 ml de una solución de $MgSO_4$ 5 mM. Se agruparon los sobrenadantes de ambas etapas de incubación, se filtraron y se cargaron en una columna IMAC (His gravitrap, GE Healthcare). A continuación, la columna se lavó con 40 volúmenes. Tras la elución (NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, NaH_2PO_4 20 mM, pH 7,4), el eluido se tamponó nuevamente utilizando columnas PD10 (GE Healthcare). A continuación, se estudiaron mediante análisis de SPR en una serie de dilución comprendida entre 200 nM y 6,25 nM los parámetros cinéticos de las Fabs purificadas.

EJEMPLO 2

- [0172] Se quimerizó el anticuerpo PR1A3 para generar un IgG1 humana/región constante kappa, y se expresó utilizando la tecnología GlycoMab con el fin de presentar un grado elevado de azúcares afucosilados en el Fc. Los anticuerpos

glucomanipulados y no glucomanipulados se compararon a una proporción de efector a diana de 25:1. La cantidad máxima de eliminación de células diana dependiente de anticuerpos se dobló mediante la glucomanipulación de la región Fc (figura 2). Se consiguió un incremento adicional de la eliminación celular mediante el incremento de la proporción de efector a diana (figura 2).

[0173] Se humanizó PR1A3 utilizando marcos idénticos a las secuencias de la línea germinal humana. La secuencia de IMGT IGHV7-4-1*02 (nº de acceso X62110) era el aceptor para VH humanizado e IMGT_hVK_1_39 (nº de acceso X59315) era el aceptor para la humanización de VL. Un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprendía un constructo de región variable de cadena pesada CH7A y un constructo de región variable de cadena ligera CL1A mostraba un nivel satisfactorio de unión a células de carcinoma de colon humano según medición mediante citometría de flujo (figura 3).

[0174] La maduración de afinidad de PR1A3 mediante expresión fágica se llevó a cabo utilizando protocolos estándares tal como se describe en detalle en el Ejemplo 1, en la presente memoria. El anticuerpo PR1A3 humanizado parental que se utilizó para la maduración de la afinidad comprendía un constructo de región variable de cadena pesada CH7A y un constructo de región variable de cadena ligera CL1A. Las Tablas 3 a 6, posteriormente, muestran las bibliotecas utilizadas para la maduración de la afinidad. Para la biblioteca L1/L2, las posiciones valina-29, alanina-50 o serina-51 dentro de las CDRs se mantuvieron constantes. Para la biblioteca H1/H2, las posiciones isoleucina-51, glicina-55 o alanina-57 dentro de las CDRs se mantuvieron constantes (figuras 4 y 5).

[0175] Un constructo de región variable de cadena pesada de afinidad madurada, CH7A rF9, y un constructo de región variable de cadena ligera de afinidad madurada, CL1A rH11, se aparearon con el constructo de región variable de cadena ligera parental y el constructo de región variable de cadena pesada, respectivamente, y entre sí. Todos los anticuerpos se convirtieron en IgG1 humana/kappa y se midió la unión de la línea celular positiva para CEA, MKN45, mediante citometría de flujo. Los anticuerpos que comprendían una región variable de cadena pesada o de cadena ligera de afinidad madurada o ambas regiones variables de cadena pesada y ligera de afinidad madurada mostraron características de unión mejoradas en comparación con el anticuerpo parental humanizado (figura

6). Las figuras 6, 10 y 15 muestran varios ejemplos en los que las cadenas ligera y pesada maduras contribuyen independientemente a una afinidad incrementada. El anticuerpo parental CH7A CL1A presenta la intensidad de señal más baja, así como el valor de EC50 más alto en las figuras 6 y 15. La cadena ligera madurada desplaza los valores de EC50 a números más bajos, mientras que las cadenas pesadas maduras (rF9 en la figura 6, y rB9 en la figura 15) desplazan la intensidad de la señal de fluorescencia total en una medición de citometría de flujo. La figura 10 muestra las contribuciones individuales de la cadena pesada y de la cadena ligera medidas mediante metodología Biacore. La combinación de dichas dos cadenas incrementa la afinidad incluso más.

[0176] Las afinidades de unión de las CDRs de cadena pesada y ligera de afinidad madurada se determinaron mediante Biacore y se listan en la Tabla 10, a continuación.

TABLA 10

SEC ID nº	CDR-H3 (los residuos aleatorizados se han subrayado los residuos seleccionados se muestran en negrita)	Afinidad (determinada mediante Biacore)	constructo
25	<u>WDFYDYVEAMDY</u>	3681 nM	PMS22
26	WDFYHYVEAMDY	586 nM	1C8
27	WDFVDYVEAMDY	1893 nM	3E1
28	WDFYWYVEAMDY	746 nM	2D7
33	WDFAHYFQTMD	59 nM	CDRH-3 de afinidad madurada
34	WDFAYYFQTMD	44 nM	CDRH-3 de afinidad madurada
35	WDFAYYLEAMD	69 nM	CDRH-3 de afinidad madurada
29	WDAFEYVKALDY	26 nM	H3 completo (5) 19

30	W D F F E Y F K T M D Y	51 nM	H3 completo (5) 8
31	W D F F Y Y V Q T M D Y	81 nM	H3 completo (5) 28
33	W D F S Y Y V E A M D Y	132 nM	H3 completo (5) 27
	CDR-H1 y CDR-H2 los residuos aleatorizados se han subrayado los residuos seleccionados se muestran en negrita		
1 y 13	<u>EFGMN</u> y <u>WINTKTGEATYVEEFKG</u>	3681 nM	pMS22
1 y 14	EFGMN y WINTKTGEATYIEEFKG	402 nM	H4E9
1 y 15	EFGMN y WINTKSGEATYVEEFKG		pAC14 (B9)
2 y 15	EYGMN y WINTKSGEATYVEEFKG		pAC15 (F9)
3 y 16	EYSMN y YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 2
2 y 17	EYGMN y WINTKNGEATYIEEFKG		H1/H2 (5) 11
1 y 16	EFGMN y YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 13
2 y 16	EYGMN y YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 14
5 y 13	<u>EFGMS</u> y <u>WINTKTGEATYVEEFKG</u>	26 nM	H3 completo (5) 19
	CDR-L1 y CDR-L2 los residuos aleatorizados se han subrayado los residuos seleccionados se muestran en negrita		
36 y 46	<u>QNVGTN</u> y <u>YSASYRYS</u>	3681 nM	pMS22
37 y 47	ANVGNN y YLASNLSG	250 nM	pAC21 (3A1)
38 y 48	KNVGTN y YLASYPQI	700 nM	pAC19 (2C6)
39 y 49	AAVGTY y YSASYRKR	220 nM	pAC18 (2F1)
40 y 50	QYASTN y YWASYRYS	290 nM	pAC23 (2F11)
36 y __	QNVGTN y PLI -YSASYRYS	402 nM	H4E9
41 y 51	HNVGTN y YSASHRYS	2255 nM	L2D2

42 y 52	QIMGPN y YLASYES		pAC6 (C1)
43 y 53	QIVGTN y YSASHRPS		pAC7 (E10)
44 y 54	QKVLTN y YLASRYRS		pAC12 (H7)
45 y 55	QTVSAN y YLASRYR		pAC13 (H11)
	CDR-L3 los residuos aleatorizados se han subrayado los residuos seleccionados se muestran en negrita		
56	H Q Y Y <u>T</u> <u>P</u> <u>L</u> F T		pMS22

[0177] La Tabla 11, a continuación, proporciona un resumen de las constantes de afinidad de las diversas secuencias de anticuerpos de afinidad madurada. Se lista el anticuerpo parental PR1A3, así como varias combinaciones de cadena ligera y cadena pesada de secuencias maduras y no maduras. Todos los valores se obtuvieron mediante tecnología Biacore mediante la medición de las constantes de tasa de asociación (K_{on}) y de la disociación (K_{off}) de los diversos constructos de anticuerpo soluble en formato Fab en un chip Biacore con reactivo NABA-avi-his inmovilizado (SEC ID nº 158) a modo de antígeno. La constante de afinidad se denomina K_D .

Tabla 11: Análisis cinético de los clones de afinidad madurada

NOMBRE DEL CLON	CADENA A	AFINIDAD MONOVALENTE	AFINIDAD BIVALENTE
PR1A3	wt/wt	k_{on} : $6,74 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $2,48 \times 10^{-2}$ 1/s; KD $3681 \times 10^{-9}M$	k_{on} : $2,82 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $5,52 \times 10^{-4}$ 1/s; KD : $2 \times 10^{-9}M$
1C8	hc/wt	k_{on} : $12,9 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,76 \times 10^{-2}$ 1/s; KD $586 \times 10^{-9}M$	k_{on} : $4,67 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $3,24 \times 10^{-4}$ 1/s; KD : $0,693 \times 10^{-9}M$
H4E9	hc/wt	k_{on} : $5,22 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,21 \times 10^{-2}$ 1/s; KD $402 \times 10^{-9}M$	k_{on} : $2,92 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $2,04 \times 10^{-3}$ 1/s; KD : $0,7 \times 10^{-9}M$

H3 Full (5) 19	hc/wt	k_{on} : $54,2 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,13 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 24×10^{-9} M	k_{on} : $9,02 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $1,75 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,19 \times 10^{-9}$ M
H3 Full (5) 8	hc/wt	k_{on} : $27,3 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,14 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 51×10^{-9} M	N/D
3A1	wt/lc	k_{on} : $46,8 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $1,17 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 250×10^{-9} M	k_{on} : $2,42 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $3,64 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $1,5 \times 10^{-9}$ M
2F1	wt/lc	k_{on} : $95,7 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $2,07 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 220×10^{-9} M	k_{on} : $4,23 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $4,10 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,952 \times 10^{-9}$ M
5L1A10	hc/wt	k_{on} : $15,6 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,09 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 59×10^{-9} M	N/D
5HFF12	hc/wt	k_{on} : $20,8 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,09 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 44×10^{-9} M	N/D
M4F1	hc/wt	k_{on} : $25,7 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,17 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 69×10^{-9} M	N/D
H4E9 x 2F1	hc/lc	k_{on} : $36,4 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,35 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 96×10^{-9} M	k_{on} : $4,23 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $1,91 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,452 \times 10^{-9}$ M
H4E9 x 3A1	hc/lc	N/D	k_{on} : $2,46 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $1,36 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,55 \times 10^{-9}$ M
1C8 x 2F1	hc/lc	k_{on} : $68,1 \times 10^3$ 1/Ms; k_{off} : $0,87 \times 10^{-2}$ 1/s; KD 128×10^{-9} M	k_{on} : $9,68 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $6,36 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,66 \times 10^{-9}$ M
1C8 x 3A1	hc/lc	N/D	k_{on} : $2,89 \times 10^5$ 1/Ms; k_{off} : $2,57 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,888 \times 10^{-9}$ M
H3 completo (5) 19 x 2F1	hc/lc	k_{on} : 206×10^3 1/Ms; k_{off} : $0,25 \times 10^{-2}$ 1/s; KD: $12,2 \times 10^{-9}$ M	k_{on} : $1,76 \times 10^6$ 1/Ms; k_{off} : $2,84 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,16 \times 10^{-9}$ M
H3 completo (5) 8 x 2F1	hc/lc	N/D	k_{on} : $9,93 \times 10^5$; 1/Ms; k_{off} : $2,71 \times 10^{-4}$ 1/s; KD: $0,28 \times 10^{-9}$ M

REIVINDICACIONES

1. Molécula de unión a antígeno (ABM) que comprende un dominio humanizado de unión a antígeno de afinidad madurada que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en la que dicho dominio de unión a antígeno se une específicamente a antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana, y en el que dicho dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3, o es capaz de competir para la unión con el mismo.

2. ABM según la reivindicación 1, en la que dicha ABM presenta una afinidad entre por lo menos aproximadamente 2 veces y aproximadamente 10 veces mayor para CEA que la ABM parental cuya afinidad no ha sido madurada.

3. ABM según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha ABM se une a CEA humano con un valor de K_D entre un valor inferior a aproximadamente 1 μM y aproximadamente 0,001 nM.

4. ABM según la reivindicación 3, en la que dicha molécula de unión a antígeno de afinidad madurada se une con un valor de K_D inferior a aproximadamente 100 nM.

5. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha ABM no presenta ninguna reactividad cruzada sustancial con CEA soluble.

6. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende por lo menos una CDR de cadena pesada o ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº1, SEC ID nº2, SEC ID nº3, SEC ID nº5, SEC ID nº6, SEC ID nº7, SEC ID nº8, SEC ID nº8, SEC ID nº10, SEC ID nº12, SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº15, SEC ID nº16, SEC ID nº17, SEC ID nº18, SEC ID nº19, SEC ID nº20, SEC ID nº21, SEC ID nº22, SEC ID nº23, SEC ID nº24, SEC ID nº25, SEC ID nº26, SEC ID nº27, SEC ID nº28, SEC ID nº29, SEC ID Nº30, SEC ID nº31,

y SEC ID nº32, SEC ID nº33, SEC ID nº34, SEC ID nº35, SEC ID nº36, SEC ID nº37, SEC ID nº38, SEC ID nº39, SEC ID nº40, SEC ID nº41, SEC ID nº42, SEC ID nº43, SEC ID nº44, SEC ID nº45, SEC ID nº46, SEC ID nº47, SEC ID nº48, SEC ID nº49, SEC ID nº50, SEC ID nº51, SEC ID N°52, SEC ID nº53, SEC ID nº54, SEC ID nº55 y SEC ID nº56 ó una combinación de las mismas.

7. ABM según la reivindicación 6, en la que dicha CDR o CDRs es una CDR de cadena pesada.

8. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

una CDR1 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº1, SEC ID nº2, SEC ID nº3, SEC ID nº5, SEC ID nº6, SEC ID nº7, SEC ID nº8, SEC ID nº9, SEC ID nº10 y SEC ID nº12, y

una CDR2 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº15, SEC ID nº16, SEC ID nº17, SEC ID nº18, SEC ID nº19, SEC ID nº20, SEC ID nº21, SEC ID nº22, SEC ID nº23 y SEC ID nº 24, y

una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº25, SEC ID nº26, SEC ID nº27, SEC ID nº28, SEC ID nº29, SEC ID nº30, SEC ID nº31, SEC ID nº32, SEC ID nº33, SEC ID nº34 y SEC ID nº35.

9. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende:

una CDR1 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº36, SEC ID nº37, SEC ID nº38, SEC ID nº39, SEC ID nº40, SEC ID nº41, SEC ID nº42, SEC ID nº43, SEC ID nº44 y SEC ID nº45, y

una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº46 y SEC ID nº47, SEC ID nº48, SEC ID nº49, SEC ID nº50, SEC ID nº51, SEC ID nº52, SEC ID nº53, SEC ID nº54 y SEC ID nº55, y

una CDR3 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 56.

10. ABM según la reivindicación 9, en la que dicha región variable de cadena pesada comprende:

SEC ID nº 9,
SEC ID nº 15, y
SEC ID nº 25, y

en la que dicha región variable de cadena ligera comprende:

SEC ID nº 45,
SEC ID nº 55, y
SEC ID nº 56.

11. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEX¹X²MX³WVRQ
APGQGLEWMGX⁴INTKX⁵GEAX⁶YX⁷EEFKGRFVFSLDTSVST
AYLQISSLKAEDEVYYCARWDX⁸X⁹X¹⁰YX¹¹X¹²X¹³X¹⁴DYWG
QGTTVTVSS,

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

12. ABM según la reivindicación 11, en la que dicha región variable de cadena pesada comprende la secuencia SEC ID nº 107.

13. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASX¹⁵X¹⁶X¹⁷X¹⁸X¹⁹X²⁰VAW
YQQKPGKAPKX²¹LIYX²²ASX²³X²⁴X²⁵X²⁶GVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIK,

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

14. ABM según la reivindicación 13, en la que dicha región variable de cadena ligera comprende la secuencia SEC ID nº 108.

15. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia SEC ID nº 107, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia SEC ID nº 108.

16. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que dicha ABM comprende por lo menos una región de marco derivada de un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

17. ABM según la reivindicación 16, en la que dicha ABM comprende las regiones de marco de cadena pesada FR 1-3 de secuencia SEC ID nº 102 y las regiones de marco de cadena ligera FR 1-3 de secuencia SEC ID nº 106.

18. Molécula de unión a antígeno (ABM) variante que comprende un dominio de unión a antígeno que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en la que dicho dominio de unión a antígeno se une específicamente a antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana, en la que dicha ABM variante comprende por lo menos una sustitución de un aminoácido en por lo menos una CDR que contribuye a la afinidad de unión incrementada de la ABM variante en comparación con una ABM parental, en la que la ABM parental comprende por lo menos una CDR del anticuerpo PR1A3 murino, en la que dicha ABM variante se une al mismo epítipo que el anticuerpo PR1A3, o es capaz de competir con el mismo, para la unión a CEA unido a membrana, y en la que dicha ABM variante no comprende la secuencia de cualquiera de entre las secuencias SEC ID nº 1 a 4.

19. ABM variante según la reivindicación 18, en la que dicha ABM variante no presenta ninguna reactividad cruzada sustancial con CEA soluble.

20. ABM variante según la reivindicación 18 ó 19, en la que dicha ABM variante presenta una afinidad de unión para CEA entre por lo menos aproximadamente 2 veces y aproximadamente 10 veces superior que dicha ABM parental.

21. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en la que dicha ABM variante se une a CEA humano con una afinidad de unión de KD inferior a entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 0,001 nM.

22. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en la que dicha ABM variante presenta una KD inferior a aproximadamente 100 nM.

23. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en la que dicha ABM parental comprende la totalidad de las seis CDRs del anticuerpo PR1A3 murino, y en la que dicha ABM variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en dichas dos o más CDRs.

24. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en la que dicha ABM variante comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº1, SEC ID nº2, SEC ID nº3, SEC ID nº5, SEC ID nº6, SEC ID nº7, SEC ID nº8, SEC ID nº8, SEC ID nº10, SEC ID nº12, SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº15, SEC ID nº16, SEC ID nº17, SEC ID nº18, SEC ID nº19, SEC ID nº20, SEC ID nº21, SEC ID nº22, SEC ID nº23, SEC ID nº24, SEC ID nº25, SEC ID nº26, SEC ID nº27, SEC ID nº28, SEC ID nº29, SEC ID Nº30, SEC ID nº31, y SEC ID nº32, SEC ID nº33, SEC ID nº34, SEC ID nº35, SEC ID nº36, SEC ID nº37, SEC ID nº38, SEC ID nº39, SEC ID nº40, SEC ID nº41, SEC ID nº42, SEC ID nº43, SEC ID nº44, SEC ID nº45, SEC ID nº46, SEC ID nº47, SEC ID nº48, SEC ID nº49, SEC ID nº50, SEC ID nº51, SEC ID Nº52, SEC ID nº53, SEC ID nº54, SEC ID nº55 y SEC ID nº56 ó una combinación de las mismas.

25. ABM variante según la reivindicación 24, en la que dicha CDR o CDRs es una CDR de cadena pesada.

26. ABM variante según la reivindicación 24 ó 25, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

una CDR1 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº1, SEC ID nº2, SEC ID nº3, SEC ID nº5, SEC ID nº6, SEC ID nº7, SEC ID nº8, SEC ID nº9, SEC ID nº10 y SEC ID nº 12, y

una CDR2 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº15, SEC ID nº16, SEC ID nº17, SEC ID nº18, SEC ID nº19, SEC ID nº20, SEC ID nº21, SEC ID nº22, SEC ID nº23 y SEC ID nº 24, y

una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº25, SEC ID nº26, SEC ID nº27, SEC ID nº28, SEC ID nº29, SEC ID nº30, SEC ID nº31, SEC ID nº32, SEC ID nº33, SEC ID nº34 y SEC ID nº35.

27. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia SEC ID nº 107.

28. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 27, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende:

una CDR1 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº36, SEC ID nº37, SEC ID nº38, SEC ID nº39, SEC ID nº40, SEC ID nº41, SEC ID nº42, SEC ID nº43, SEC ID nº44 y SEC ID nº45, y

una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº46 y SEC ID nº47, SEC ID nº48, SEC ID nº49, SEC ID nº50, SEC ID nº51, SEC ID nº52, SEC ID nº53, SEC ID nº54 y SEC ID nº55, y

una CDR3 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 56.

29. ABM variante según la reivindicación 28, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia SEC ID nº 108.

30. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende:

SEC ID nº 9,

SEC ID nº 15, y

SEC ID nº 25, y

en la que dicha región variable de cadena ligera comprende:

SEC ID nº 45,

SEC ID nº 55, y

SEC ID nº 56.

31. ABM variante según la reivindicación 30, en la que dicho dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia SEC ID nº 107, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia SEC ID nº 108.

32. ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, en la que dicha ABM variante comprende por lo menos una región de marco derivada de un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

33. ABM variante según la reivindicación 32, en la que dicha ABM variante comprende las regiones de marco de cadena pesada FR 1-3 de secuencia SEC ID nº 102, y las regiones de marco de cadena ligera FR 1-3 derivadas de la secuencia SEC ID nº 106.

34. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 33, en la que dicha ABM o dicha ABM variante comprende una región Fc.

35. ABM o ABM variante según la reivindicación 34, en la que dicha región Fc es una región Fc de IgG humana.

36. ABM o ABM variante según la reivindicación 34 ó 35, en la que la región Fc es una región Fc glucomanipulada.

37. ABM o ABM variante según la reivindicación 36, en la que entre por lo menos aproximadamente 20% y aproximadamente 100% de los oligosacáridos N-ligados en dicha región Fc no se encuentran fucosilados.

38. ABM o ABM variante según la reivindicación 36, en la que entre por lo menos aproximadamente 20% y aproximadamente 100% de los oligosacáridos N-ligados en dicha región Fc son biantenarios.

39. ABM o ABM variante según la reivindicación 36, en la que entre por lo menos aproximadamente 20% y aproximadamente 50% de los oligosacáridos N-ligados en dicha región Fc son biantenarios no fucosilados.

40. ABM o ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, en la que dicha ABM o ABM variante presente tiene por lo menos una función efectora incrementada.

41. ABM o ABM variante según la reivindicación 40, en la que dicha función o funciones efectoras incrementadas se seleccionan de entre el grupo que consiste de: afinidad de unión a receptor de Fc incrementada, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) incrementada, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a monocitos, unión incrementada a células polimorfonucleares, señalización directa inductora de apoptosis, maduración de células dendríticas incrementada y sensibilización de las células T incrementada.

42. ABM o ABM variante según la reivindicación 41, en la que dicha función efectora incrementada es ADCC incrementada o unión incrementada a células NK.

43. ABM o ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 42, en la que dicha ABM o ABM variante presenta un incremento de la ADCC de entre

por lo menos aproximadamente 40% y aproximadamente 100% en comparación con dicha molécula parental de unión a antígeno.

44. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 33, en la que dicha ABM o dicha ABM variante es un anticuerpo o fragmento del mismo seleccionado de entre el grupo que consiste de: un anticuerpo completo, un fragmento scFv, un fragmento Fv, un fragmento F(ab')₂, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo y un tetracuerpo.

45. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 44, o ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 44, en la que dicha ABM o dicha ABM variante incrementa el tiempo de supervivencia máximo en un modelo animal de enfermedad entre por lo menos aproximadamente 10 y aproximadamente 120 días en comparación con dicha ABM parental.

46. ABM o ABM variante según la reivindicación 45, en la que dicho modelo animal de enfermedad es un modelo de xenoinjerto tumoral de ratón utilizando células de carcinoma colorrectal humano LS174T.

47. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 46, o ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 43, en la que dicha ABM o ABM variante incrementa la ADCC entre por lo menos aproximadamente 10% y aproximadamente 100% en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

48. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 47, o ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 43, en la que dicha ABM o dicha ABM variante es entre por lo menos aproximadamente 10 veces y aproximadamente 1.000 veces más potente en la inducción de ADCC a una concentración dada que el anticuerpo PR1A3 murino.

49. ABM o ABM variante según la reivindicación 48, en la que la ADCC se mide mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

50. Polipéptido aislado que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CEA unido a membrana, en el que dicho dominio de unión a antígeno comprende una o más secuencias de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº1, SEC ID nº2, SEC ID nº3, SEC ID nº5, SEC ID nº6, SEC ID nº7, SEC ID nº8, SEC ID nº9, SEC ID nº10, SEC ID nº12, SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº15, SEC ID nº16, SEC ID nº17, SEC ID nº18, SEC ID nº19, SEC ID nº20, SEC ID nº21, SEC ID nº22, SEC ID nº23, SEC ID nº24, SEC ID nº25, SEC ID nº26, SEC ID nº27, SEC ID nº28, SEC ID nº29, SEC ID Nº30, SEC ID nº31, y SEC ID nº32, SEC ID nº33, SEC ID nº34, SEC ID nº35, SEC ID nº36, SEC ID nº37, SEC ID nº38, SEC ID nº39, SEC ID nº40, SEC ID nº41, SEC ID nº42, SEC ID nº43, SEC ID nº44, SEC ID nº45, SEC ID nº46, SEC ID nº47, SEC ID nº48, SEC ID nº49, SEC ID nº50, SEC ID nº51, SEC ID Nº52, SEC ID nº53, SEC ID nº54, SEC ID nº55 y SEC ID nº56 ó una combinación de las mismas.

51. Polipéptido aislado que comprende una primera secuencia y una segunda secuencia, en el que dicha primera secuencia comprende una o más secuencias de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº1, SEC ID nº2, SEC ID nº3, SEC ID nº5, SEC ID nº6, SEC ID nº7, SEC ID nº8, SEC ID nº9, SEC ID nº10, SEC ID nº12, SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº15, SEC ID nº16, SEC ID nº17, SEC ID nº18, SEC ID nº19, SEC ID nº20, SEC ID nº21, SEC ID nº22, SEC ID nº23, SEC ID nº24, SEC ID nº25, SEC ID nº26, SEC ID nº27, SEC ID nº28, SEC ID nº29, SEC ID Nº30, SEC ID nº31 y SEC ID nº32, SEC ID nº33, SEC ID nº34 y SEC ID nº35, y

en la que dicha segunda secuencia comprende una o más secuencias de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº36, SEC ID nº37, SEC ID nº38, SEC ID nº39, SEC ID nº40, SEC ID nº41, SEC ID nº42, SEC ID nº43, SEC ID nº44, SEC ID nº45, SEC ID nº46, SEC ID nº47, SEC ID nº48, SEC ID nº49, SEC ID nº50, SEC ID nº51, SEC ID nº52, SEC ID nº53, SEC ID nº54, SEC ID nº55 y SEC ID nº56

52. Polipéptido aislado que comprende una secuencia que es entre por lo menos aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: las secuencias SEC ID nº 101, 105,

107, 108 y 188 a 216, en el que dicho polipéptido se une específicamente a CEA unido a membrana.

53. Molécula de unión a antígeno humanizada específica para CEA unido a membrana que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 52.

54. Molécula de unión a antígeno humanizada según la reivindicación 53, en la que dicha molécula de unión a antígeno humanizada no presenta reactividad cruzada sustancial con CEA soluble.

55. Anticuerpo que se une específicamente a CEA unido a membrana, comprendiendo dicho anticuerpo la región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº 107 y la región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 108, en el que dicho anticuerpo presenta una ADCC incrementada en comparación con el anticuerpo PR1A3 murino.

56. Anticuerpo según la reivindicación 55, en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc que ha sido glucomanipulada.

57. Anticuerpo según la reivindicación 55 ó 56, en el que dicho anticuerpo no presenta reactividad cruzada sustancial con CEA soluble.

58. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 57, en el que dicho anticuerpo incrementa el tiempo de supervivencia máxima en un modelo animal de enfermedad entre por lo menos aproximadamente 10 y aproximadamente 120 días en comparación con el anticuerpo PR1A3 murino.

59. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 58, en el que dicho anticuerpo incrementa la ADCC entre por lo menos aproximadamente 10% y aproximadamente 100% en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

60. Polinucleótido aislado codificante del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 52.

61. Composición que comprende una primera secuencia polinucleótida aislada y una segunda secuencia polinucleótida aislada, en la que dicha primera secuencia polinucleótida aislada es entre por lo menos aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: las secuencias SEC ID nº 113, 119 y 159 a 177, y en la que dicha segunda secuencia polinucleótida aislada es entre por lo menos aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 117, 120 y 178 a 187, en el que dichos polinucleótidos codifican polipéptidos que se unen específicamente a CEA unido a membrana.

62. Composición según la reivindicación 61, en la que dicho primer polinucleótido aislado es la secuencia SEC ID nº 119, y en la que dicho segundo polinucleótido aislado es la secuencia SEC ID nº 120.

63. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho primer polinucleótido aislado codifica el polipéptido de secuencia SEC ID nº 107, y en el que dicho segundo polinucleótido aislado codifica el polipéptido de secuencia SEC ID nº 108.

64. Polinucleótido aislado codificante de un polipéptido específico para CEA unido a membrana, en el que dicho polinucleótido comprende una o más secuencias codificantes de CDR de cadena pesada seleccionadas de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 57 a 77.

65. Polinucleótido aislado según la reivindicación 64, en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia que es entre por lo menos aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a la secuencia SEC ID nº 119.

66. Polinucleótido aislado codificante de un polipéptido específico para CEA unido a membrana , en el que dicho polinucleótido comprende una o más secuencias codificantes de CDR de cadena ligera seleccionadas de entre el grupo que consiste de: las secuencias SEC ID nº 78 a 98.

67. Polinucleótido aislado según la reivindicación 66, en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia que es entre por lo menos aproximadamente 80% y aproximadamente 100% idéntica a la secuencia SEC ID nº 120.

68. Vector que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 60 a 67.

69. Vector según la reivindicación 68, en el que dicho vector es un vector de clonación o un vector de expresión.

70. Vector según la reivindicación 68, en el que dicho vector es un vector adecuado para construir una biblioteca de expresión fágica.

71. Célula huésped que comprende el vector según cualquiera de las reivindicaciones 68 a 70.

72. Célula huésped que comprende un primer polinucleótido aislado y un segundo polinucleótido aislado, en la que dicho primer polinucleótido aislado comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 113, 119 y 159 a 177, y en la que dicho segundo polinucleótido aislado comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias SEC ID nº 8 y SEC ID nº 117, 120 y 178 a 187.

73. Método para producir una ABM que se une específicamente a CEA humano unido a membrana, comprendiendo dicho método:

- (a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 71 ó 72 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido, en la que dicho polinucleótido codifica un polipéptido que forma parte de dicha ABM, y
 - (b) recuperar dicha ABM,
- en la que dicha ABM o una parte de la misma se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal PR1A3 murino, o es capaz de competir para la unión con el mismo.

74. Composición que comprende la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, o el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, y un portador farmacéuticamente aceptable.

75. Método para inducir la lisis celular de una célula tumoral, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula tumoral con la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, o la composición según la reivindicación 74.

76. Método según la reivindicación 75, en el que dicha célula tumoral se selecciona de entre el grupo que consiste de células de cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), células de cáncer gástrico, células de cáncer pancreático y células de cáncer de mama.

77. Método según la reivindicación 75, en el que dicha lisis celular es inducida por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de dicha ABM, ABM variante.

78. Método de diagnóstico de enfermedades en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración en dicho sujeto de una cantidad eficaz de un agente diagnóstico, en el que dicho agente diagnóstico comprende la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según

cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, o el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, y un marcaje que permite la detección de un complejo de dicho agente diagnóstico y CEA.

79. Método según la reivindicación 78, en el que dicho marcaje es un agente de formación de imágenes.

80. Método de tratamiento de un sujeto que presenta un cáncer que expresa CEA anormalmente, comprendiendo dicho método la administración en dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, o la composición según la reivindicación 74.

81. Método para incrementar el tiempo de supervivencia en un sujeto que presenta un cáncer que expresa CEA anormalmente, comprendiendo dicho método la administración en dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, o la composición según la reivindicación 74.

82. Método según la reivindicación 80 ó 81, en el que dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama.

83. Método para inducir en un sujeto la regresión de un tumor que expresa CEA anormalmente, comprendiendo dicho método la administración en dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, o la composición según la reivindicación 74.

84. Método según la reivindicación 83, en el que dicho tumor es un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama.

85. Método según cualquiera de las reivindicaciones 80 a 84, en el que dicha ABM o dicha ABM variante se administra en combinación con quimioterapia o terapia de radiación.

86. Método según cualquiera de las reivindicaciones 80 a 85, en el que dicha ABM o dicha ABM variante o dicha composición se administra con un agente quimioterapéutico.

87. Método según cualquiera de las reivindicaciones 78 a 86, en el que dicho sujeto es un ser humano.

88. Método de inhibición de la adhesión celular mediada por CEA de una célula tumoral que expresa CEA anormalmente, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula tumoral con una cantidad eficaz de la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, o la composición según la reivindicación 74.

89. Utilización de la ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 34 a 49, la ABM variante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 49, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, o la composición según la reivindicación 74 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto que presenta un cáncer que expresa CEA anormalmente.

90. Utilización según la reivindicación 89, en la que dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer de mama.

91. Polinucleótido aislado según la reivindicación 64, en el que dicho polinucleótido comprende:

a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 57, SEC ID nº 58, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, y

b) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 62, SEC ID nº 63, SEC ID nº 64, SEC ID nº 65, SEC ID nº 66, y

c) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 67, SEC ID nº 68, SEC ID nº 69, SEC ID nº 70, SEC ID nº 71, SEC ID nº 72, SEC ID nº 73, SEC ID nº 74, SEC ID nº 75, SEC ID nº 76 y SEC ID nº 77.

92. Polinucleótido aislado según la reivindicación 91, en el que dicho polinucleótido comprende:

SEC ID nº 58,

SEC ID nº 64, y

SEC ID nº 67.

93. Polinucleótido aislado según la reivindicación 91, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia SEC ID nº 119.

94. Polinucleótido aislado según la reivindicación 66, en el que dicho polinucleótido comprende:

a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 78, SEC ID nº 79, SEC ID nº 80, SEC ID nº 81, SEC ID nº 82, SEC ID nº 83, SEC ID nº 84, SEC ID nº 85, SEC ID nº 86, SEC ID nº 87, y

b) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: SEC ID nº 88, SEC ID nº 89, SEC ID nº 90, SEC ID nº 91, SEC ID nº 92, SEC ID nº 93, SEC ID nº 94, SEC ID nº 95, SEC ID nº 96, SEC ID nº 97, y

c) una secuencia SEC ID nº 98.

95. Polinucleótido aislado según la reivindicación 94, en el que dicho polinucleótido comprende:

SEC ID nº 87,

SEC ID nº 97, y
SEC ID nº 98.

96. Polinucleótido aislado según la reivindicación 94, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia SEC ID nº 120.

97. Invención tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

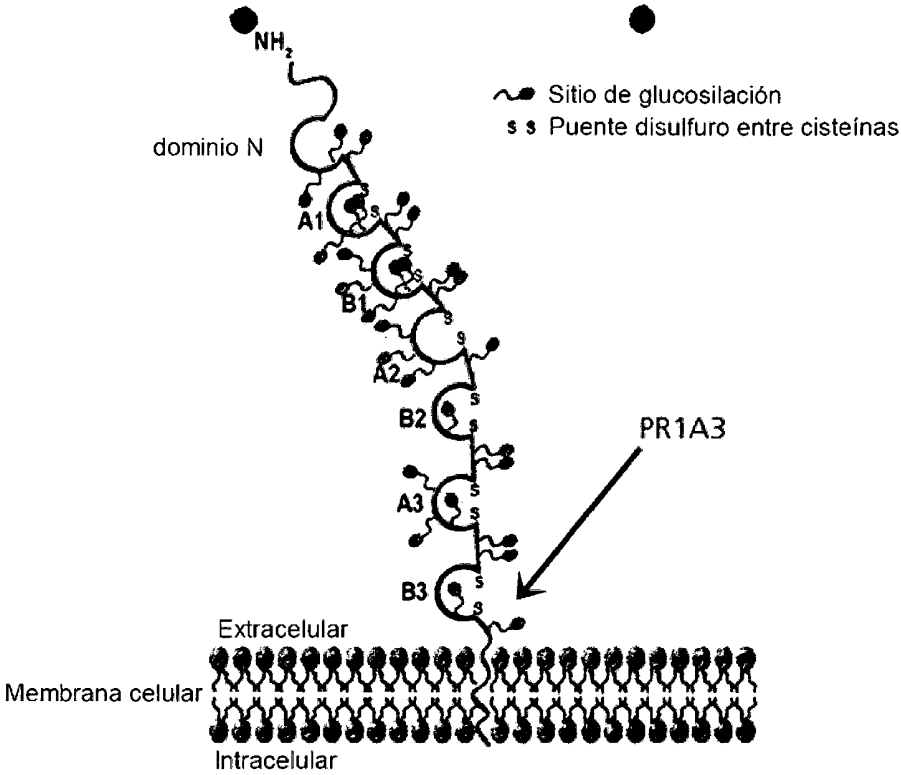


Fig. 1

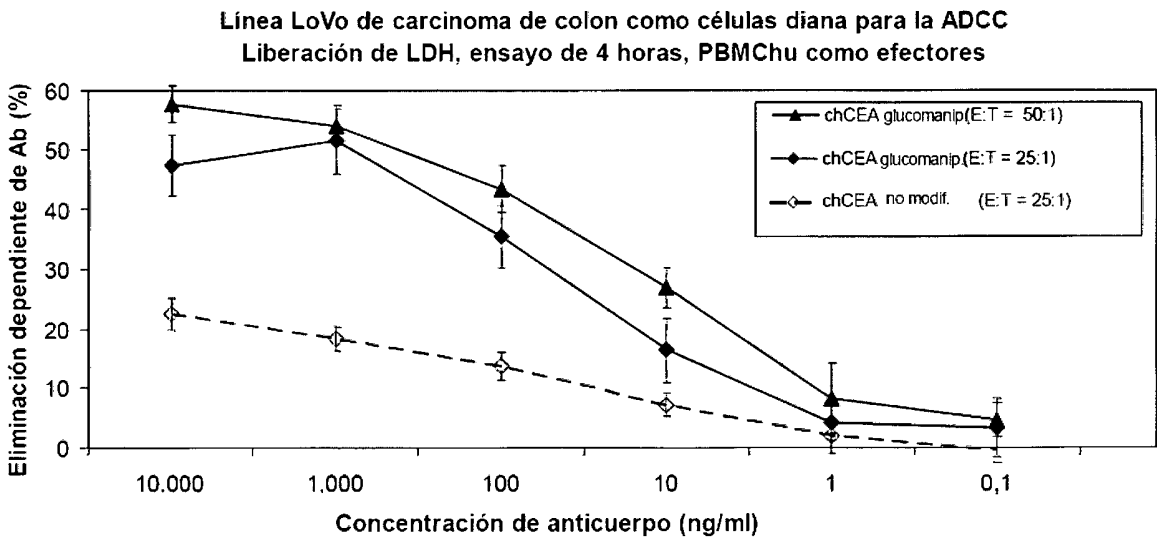


Fig. 2

Unión a células LoVo de carcinoma de colon humano medida mediante FACS

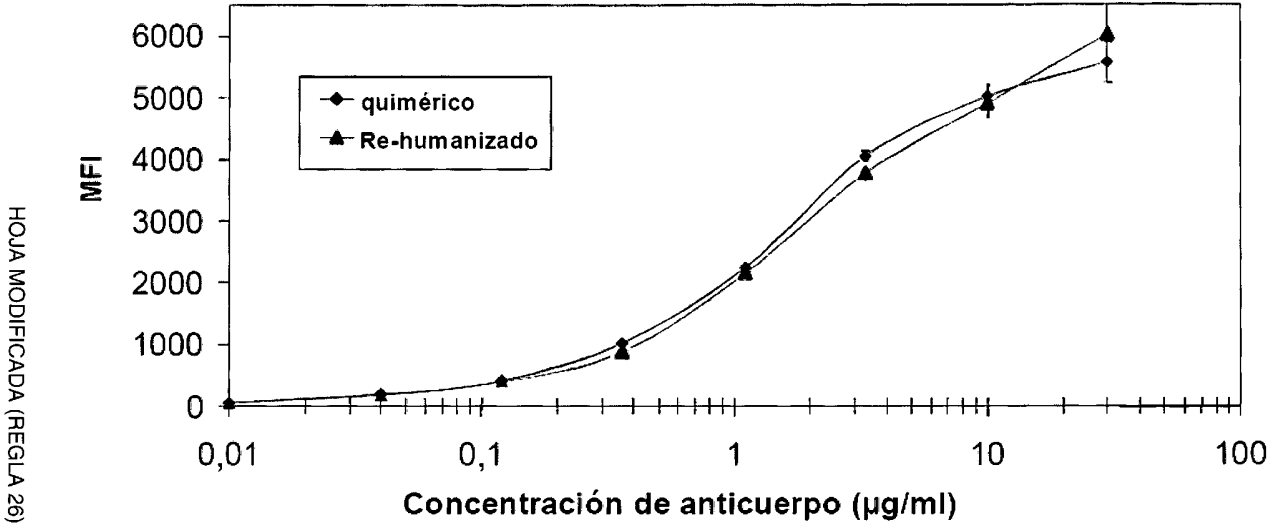


Fig. 3

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

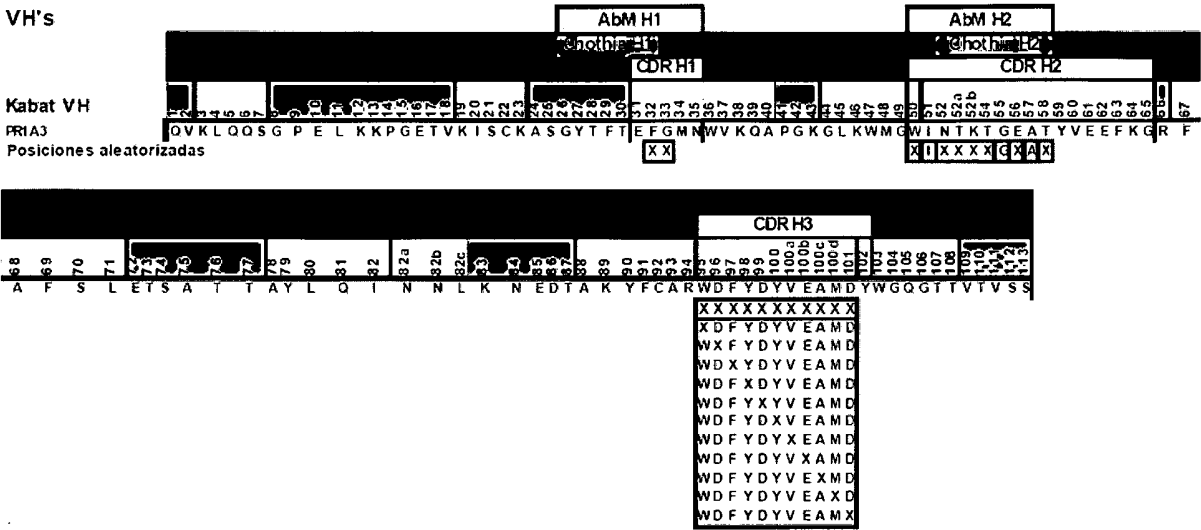


Fig. 5

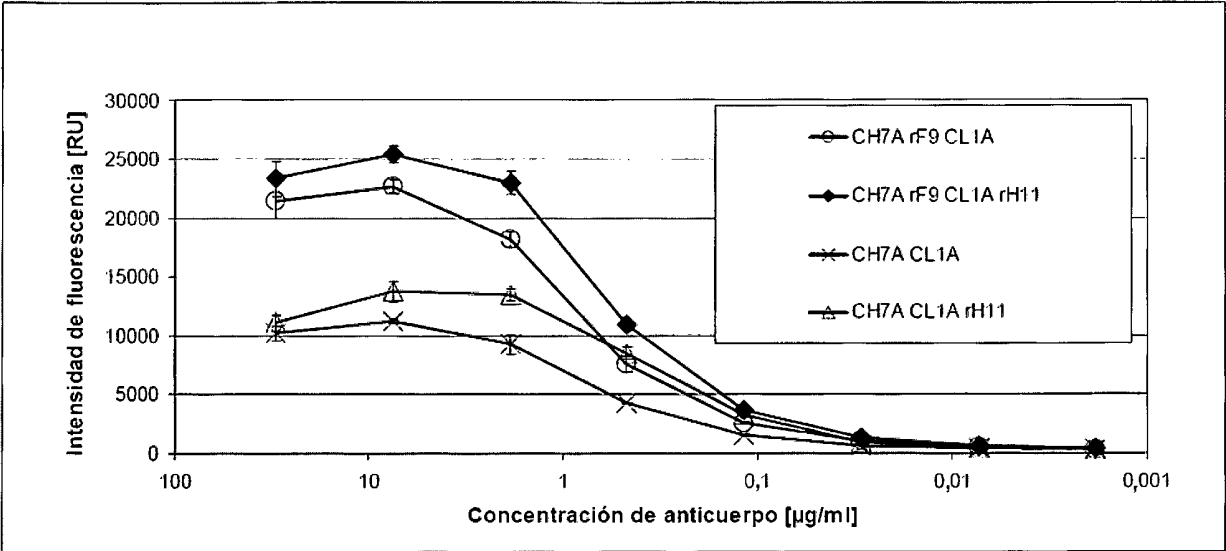


Fig. 6

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

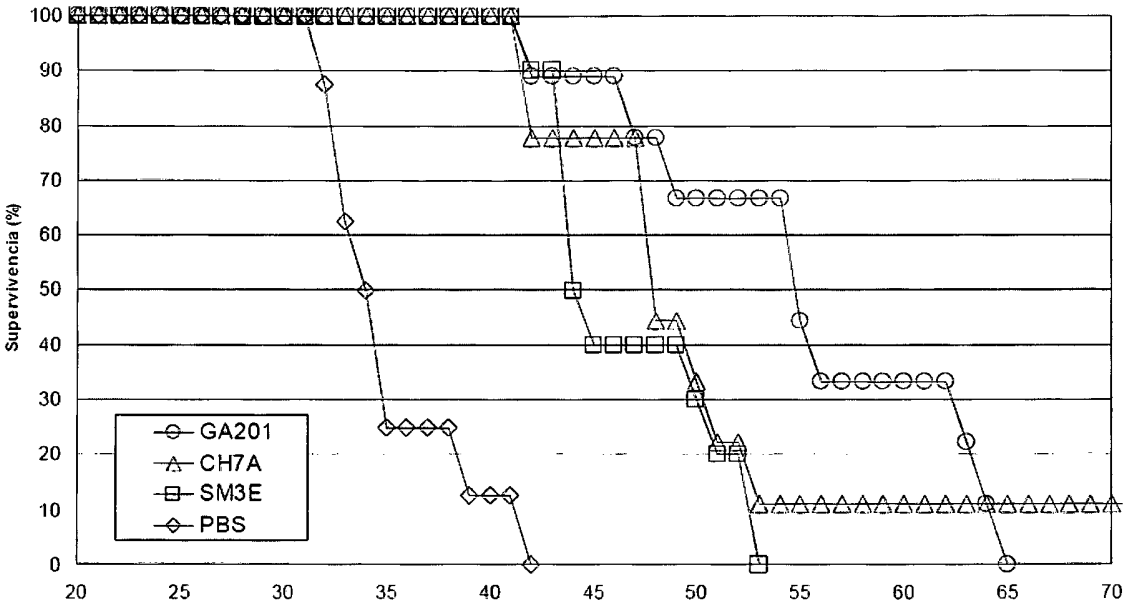
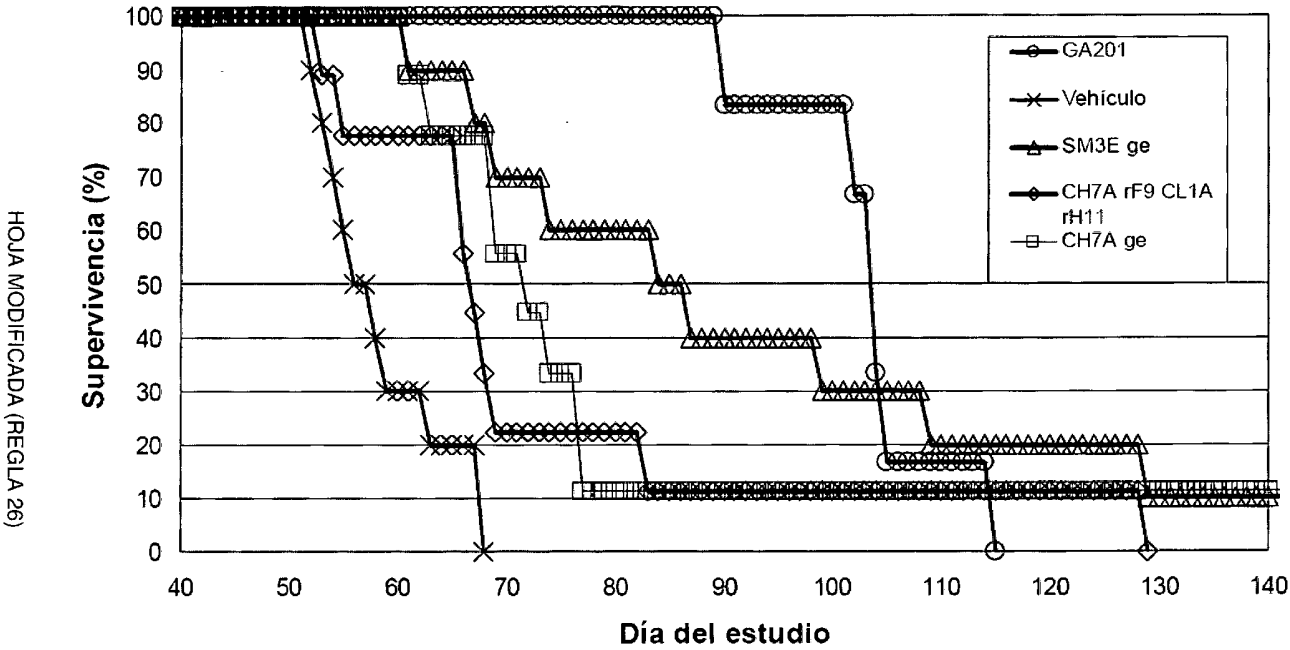


Fig. 7

Modelo de metástasis pulmonar A549



HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

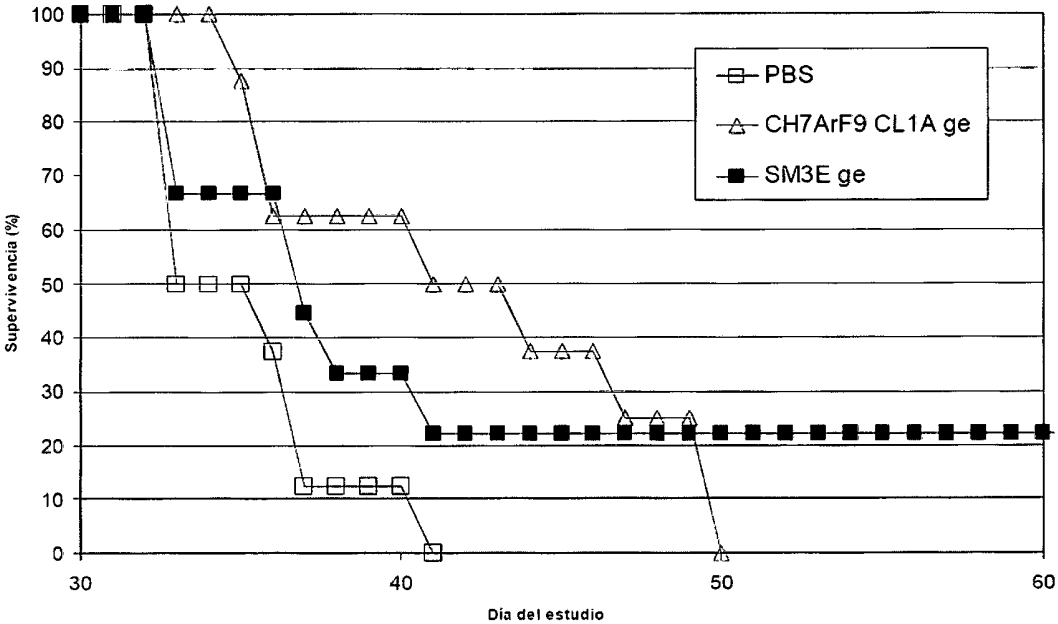


Fig. 9

Sensograma de Fabs anti-CEA

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

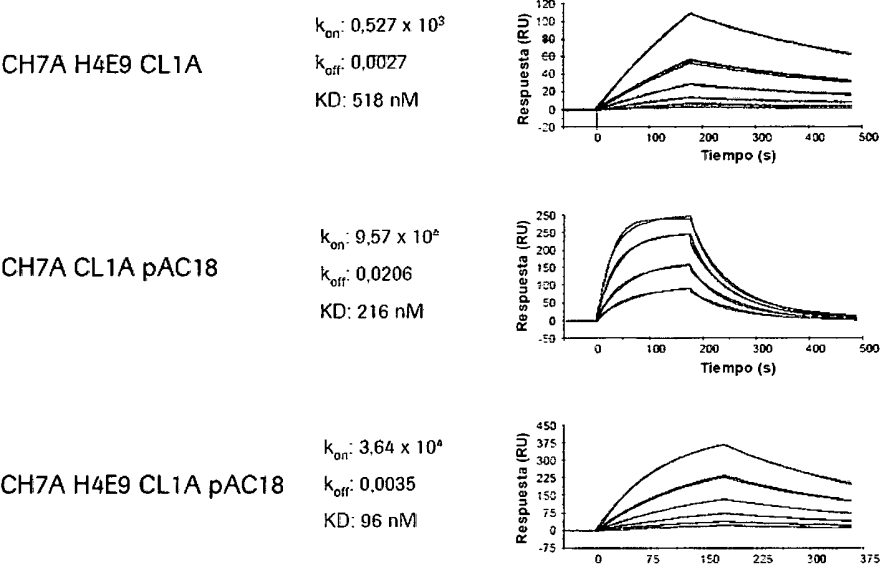


Fig. 10

aleatorización de CDR1 y CDR2 de VH (CH7A)

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

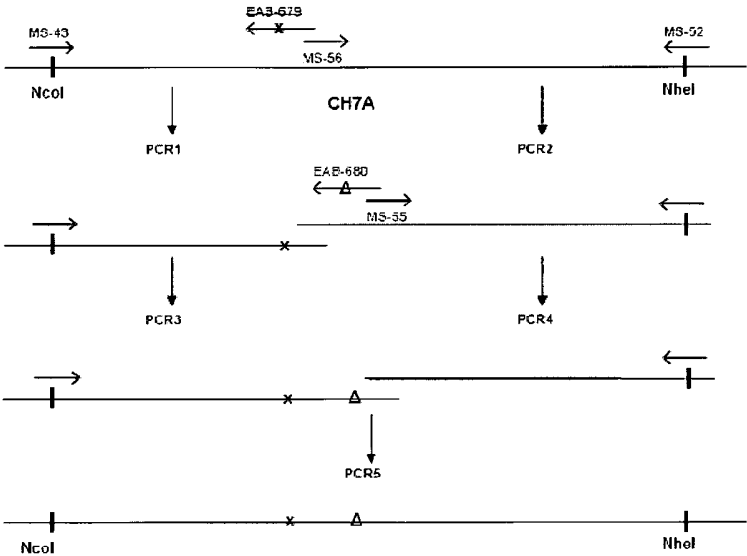


Fig. 11

aleatorización de CDR1 y CDR2 de VL(CL1A)

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

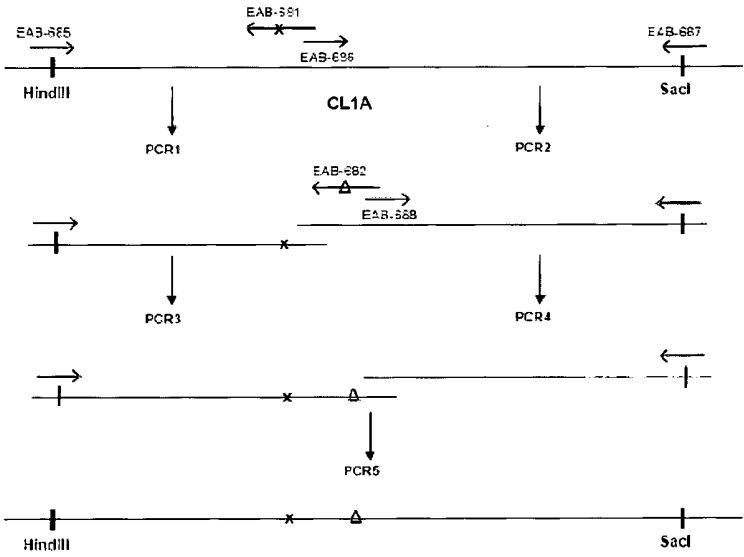


Fig. 12

aleatorización de CDR3 de VH (CH7A)

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

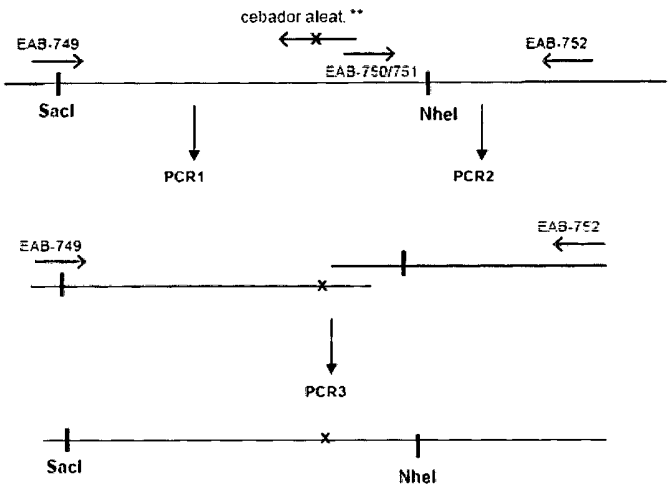


Fig. 13

aleatorización de CDR3 de VL (CL1A)

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

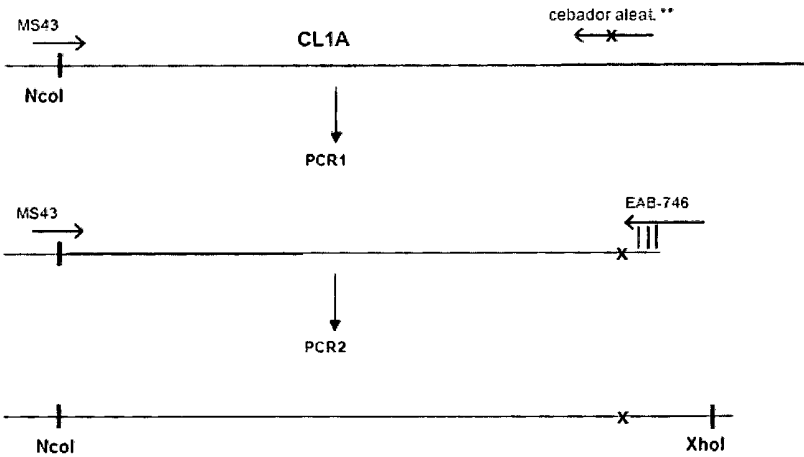
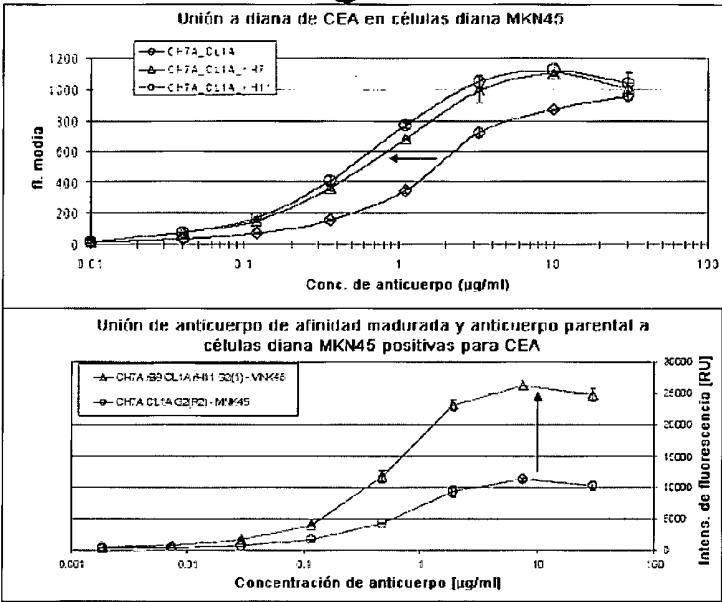


Fig. 14



El clon de afinidad madurada procedente de la biblioteca de cadena ligera presenta un incremento de la afinidad de factor 3, al convertirlo en IgG

El clon de afinidad madurada procedente de la biblioteca de cadena pesada muestra una señal fuertemente incrementada, al convertirlo en IgG

-> Tanto la cadena pesada como la ligera del anticuerpo contribuyen a la afinidad del anticuerpo completo (se conserva la unión a la forma unida a membrana tras la maduración de la afinidad)

Fig. 15

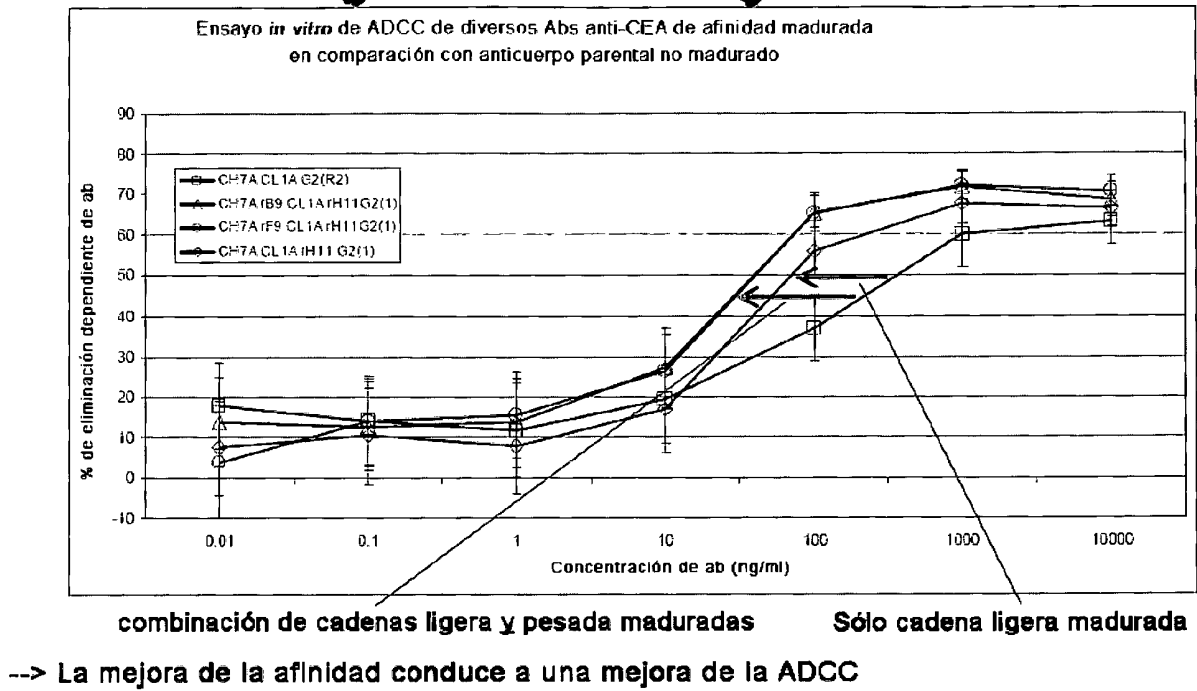


Fig. 16

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG

<120> ANTICUERPOS PARA CEA

<130> 26372

<150> US 61/238,505

<151> 2009-08-31

<160> 216

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR1 Kabat

<400> 1

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR1 Kabat

<400> 2

Glu Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR1 Kabat

<400> 3

Glu Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de Cadena Pesada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Xaa = Tyr or Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> Xaa = Ser or Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Xaa = Asn or ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(50)
<223> Xaa = Trp or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(55)
<223> Xaa = Thr, Ser, or Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(59)
<223> Xaa = Thr or Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> Xaa = Val or Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> Xaa = Phe or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (102)..(102)
<223> Xaa = Val, Phe, Ser, Tyr, or Ala

<220>

333972.TXT

<221> MISC_FEATURE
<222> (103)..(103)
<223> Xaa = Asp, His, Trp, Glu or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> Xaa = Val, Phe, or Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> Xaa = Glu, Lys or Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107)..(107)
<223> Xaa = Ala or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (108)..(108)
<223> Xaa = Met or Leu

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

Página 3

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1 Kabat

<400> 5

Glu Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1 Chothia

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1 Chothia

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1 AbM

<400> 8

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

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1 AbM

<400> 9

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

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1 AbM

<400> 10

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

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de Cadena Ligera

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> Xaa = Gln, Ala, Lys, or His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> Xaa = Asn, Ala, Tyr, Ile, Lys, or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa = Val, Ala, Gly, or Met

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)
 <223> Xaa = Gly, Ser, Thr, or Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = Thr, Asn, Pro, or Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa = Asn or Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa = Pro or Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa = Ser, Leu, or Trp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa = Tyr, Asn, or His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa = Arg, Leu, Pro, or His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> Xaa = Tyr, Ser, Gln, Lys, Phe, Pro, or Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(56)
 <223> Xaa = Ser, Gly, Ile, or Arg

<400> 11

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1 AbM

<400> 12

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

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2 Kabat

<400> 13

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

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2 Kabat

<400> 14

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

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR2 Kabat

<400> 15

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

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR2 Kabat

<400> 16

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

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR2 Kabat

<400> 17

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

Gly

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2 Chothia

<400> 18

Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2 Chothia

<400> 19

Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2 Chothia

<400> 20

Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn
1 5

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR2 AbM

<400> 21

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

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR2 AbM

<400> 22

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

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR2 AbM

<400> 23

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

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR2 AbM

<400> 24

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

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 25

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

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 26

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

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 27

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

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 28

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

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 29

Trp Asp Ala Phe Glu Tyr Val Lys Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 30

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

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 31

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

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 32

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

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 33

Trp Asp Phe Ala His Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 34

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

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 35

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

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 36

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

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 37

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

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 38

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

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 39

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

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 40

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

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 41

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

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 42

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

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 43

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

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 44

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

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 45

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

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 46

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 47

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ser Gly
1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 48

Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Gln Ile
1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 49

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 50

Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 51

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 52

Tyr Leu Ala Ser Tyr His Glu Ser
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 53

Tyr Ser Ala Ser His Arg Pro Ser
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 54

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 55

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg
1 5

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR3

<400> 56

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

<210> 57
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1

<400> 57
ggatacacct tcactgagtt tggaatgaac

30

<210> 58
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1

<400> 58
ggatacacct tcactgagta tggatgaac

30

<210> 59
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1

<400> 59
ggatacacct tcactgagta ttctatgaac

30

<210> 60
<211> 0
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> EN BLANCO

<400> 60
000

<210> 61
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR1

<400> 61
ggatacacct tcactgagtt tggaatgagc

30

<210> 62
<211> 51

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2

<400> 62
tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatgtgaag agttaaggg a 51

<210> 63
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2

<400> 63
tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatattgaag agttaaggg a 51

<210> 64
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2

<400> 64
tggataaaca ccaaaagtgg agaggcaaca tatgtgaag agttaaggg a 51

<210> 65
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2

<400> 65
tatataaaca ccaaaaatgg agaggcaaac tatgtgaag agttaaggg a 51

<210> 66
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR2

<400> 66
tggataaaca ccaaaaatgg agaggcaaca tatattgaag agttaaggg a 51

<210> 67
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 67
tgggacttct atgattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 68
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 68
tgggacttct atcattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 69
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 69
tgggacttctg tggattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 70
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 70
tgggacttct attgttacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 71
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 71
tgggacgcct ttgagtacgt gaaggcgctg gactac 36

<210> 72
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 72
tgggattct ttgagtatt taagactatg gactac 36

<210> 73
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 73
tgggactttt ttattacgt gcagactatg gactac 36

<210> 74
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 74
tgggattttt ctattacgt tgaggcgatg gactac 36

<210> 75
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 75
tgggactftg ctctactt tcagactatg gactac 36

<210> 76
<211> 36

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 76
tgggacttcg cttattactt tcagactatg gactac 36

<210> 77
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Pesada CDR3

<400> 77
tgggatttcg cgtattacct tgaggctatg gactac 36

<210> 78
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 78
aaggccagtc agaattgtggg tactaatgtt gcc 33

<210> 79
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 79
aaggccagtg ccaattgtggg taataatgtt gcc 33

<210> 80
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 80
aaggccagta agaattgtggg gactaatgtt gcg 33

<210> 81
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 81
aaggccagtg cggctgtggg tacgtatgtt gcg 33

<210> 82
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 82
aaggccagtc agatagcgag tactaatgtt gcc 33

<210> 83
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 83
aaggccagtc acaatgtggg taccaacgtt gcg 33

<210> 84
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 84
aaggccagtc agattatggg tcctaatgtt gcg 33

<210> 85
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 85

aaggccagtc aaattgtggg tactaatgtt gcg

33

<210> 86

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 86

aaggccagtc agaaggtgct tactaatgtt gcg

33

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR1

<400> 87

aaggccagtc agactgtgag tgctaatgtt gcg

33

<210> 88

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 88

tattcgcat cctaccgcta cagt

24

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 89

tattggcct ccaacctctc cggt

24

<210> 90

<211> 24

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 90
tacctggcat cctaccccca gatt 24

<210> 91
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 91
tattcggcat cctaccgcaa aagg 24

<210> 92
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 92
tattgggcat cctaccgcta tagt 24

<210> 93
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 93
tattcggcat cccaccggta cagt 24

<210> 94
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 94
tatttggcat cctaccacga aagt 24

333972.TXT

<210> 95
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 95
tattcgcat cccaccgtcc cagt 24

<210> 96
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 96
tatttggcat cctaccgcta cagt 24

<210> 97
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR2

<400> 97
tatttggcat cctaccgcta caga 24

<210> 98
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena Ligera CDR3

<400> 98
caccaatatt acacctatcc tctattcacg 30

<210> 99
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PR1A3 VH

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pEM1496 huPR1A3 VH

<400> 100

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CH7A

<400> 101

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

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

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

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

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

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

Página 29

333972.TXT

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 102
<211> 98
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IGHV7-4-1*02

<400> 102

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 103
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PR1A3 VL

<400> 103

333972.TXT

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

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

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

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

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

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

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

<210> 104

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pEM1495 huPR1A3 VL

<400> 104

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

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

<210> 105
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CL1A

<400> 105

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

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

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

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

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

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

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

<210> 106
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IMGT_hVK_1_39

333972.TXT

<400> 106

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

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

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

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

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

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

<210> 107

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CH7 rF9

<400> 107

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CLA1 rH11

<400> 108

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

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

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

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

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

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

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

<210> 109
<211> 0
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EN BLANCO

<400> 109
000

<210> 110
<211> 0
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> EN BLANCO

<400> 110
000

<210> 111
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PR1A3 VH

<400> 111
caggtgaagc tgcagcagtc aggacctgag ttgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tcttgaagg ctctggata taccttcaca gaattcgga tgaactgggt gaagcaggct 120
cctggaaagg gtttaaagt gatgggctgg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gttgccttc tcttggaga cctctgccac cactgcctat 240
ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctaaat attctgtgc tcatgggat 300
ttctatgact atgtgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360
tca 363

<210> 112
<211> 362
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pEM1496

<400> 112
caggtgcagc tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcttgaagg ctctggata caccttcact gatttgaat gaactgggtg cgacaggccc 120
ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga taaacaccaa aactggagag gcaacatatg 180
ttgaagagtt taagggacgg ttgtcttct ccttgacac ctctgtcagc acggcatatc 240

333972.TXT

tcgagatcag cagcctaaag gctgacgaca ctgccgtgta ttactgtgcg agatgggact 300
tctatgatta cgtggaggct atggactact ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct 360
ca 362

<210> 113
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CH7A

<400> 113
caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg ctctggata caccttact gagttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggaag gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 114
<211> 294
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IGHV7-4-1*02

<400> 114
caggtgcagc tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg ctctggata caccttact agctatgcta tgaattgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacca aactgggaa cccaacgtat 180
gcccagggtc tcacaggagc gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gaga 294

<210> 115
<211> 330
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

333972.TXT

<220>

<223> PR1A3 VL

<400> 115

gatatcgtga tgacccagtc tcaaagattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtc gaattgtgggt actaatgttg cctggtatca acagaaacca 120
ggacaatccc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtacagtct 240
gaagactgg cggagtattt ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt caggttcggc 300
tcggggacaa agttggaaat gaaacgtacg 330

<210> 116

<211> 327

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pEM1495

<400> 116

gacatccaga tgactcagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60
atcacctgta aggccagtc gaattgtgggt actaatgttg cctggtacca gcagaagcca 120
ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcctacc ggtacagtgg tgtccaagc 180
agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac ttacacttca ccatcagcag cctccagcca 240
gaggacatcg ccacctacta ctgccaccaa tattacacct atcctctatt caggttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacgt 327

<210> 117

<211> 324

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CL1A

<400> 117

gataccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcactgca aggccagtc gaattgtgggt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

333972.TXT

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caag 324

<210> 118
<211> 285
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IMGT_hVK_1_39

<400> 118
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggaac tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccct 285

<210> 119
<211> 369
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CH7 rF9

<400> 119
caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg ctctggata caccttact gagtatggtg tgaactgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat 180
gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tcagctagc 369

<210> 120
<211> 330
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

333972.TXT

<223> CLA1 rH11

<400> 120

gatatccaga tgaccacgac tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtca gactgtgagt gctaattgtg cgtgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcatcctacc gctacagagg agtcccatca 180
agggtcagtg gcagtgagtc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 121

<211> 987

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IgG1

<400> 121

accaagggcc catcggctct ccccttgga cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 60
gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttcccgaac cgttgacggt gtcgtggaac 120
tcaggcgccc tgaccagcgg ctgtcacacc ttccggctg tctacagtc ctcaggactc 180
tactcctca gcagcgtgtt gacgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 240
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccacatc 300
tgtgacaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 360
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac cctgaggtc 420
acatgcgtgg tgggtgacgt gagccaagaa gacctgagg tcaagtcaa ctggtacgtg 480
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 540
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 600
aagtgaagg tctccaacaa agccctcca gcccctatg agaaaacct ctcaaagcc 660
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga tgagctgacc 720
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggctct atccagcga catgcctgtg 780
gagtgggaga gcaatggga gccggagaac aactacaaga ccagcctcc cgtgctggac 840
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag 960

333972.TXT

agcctctccc tgtctccggg taaatga

987

<210> 122

<211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IgG1

<400> 122

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
130 135 140

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
165 170 175

Página 40

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
180 185 190

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
195 200 205

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
275 280 285

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
290 295 300

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 123
<211> 42
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador MS-43

<400> 123
ccagccggcc atggccgata tccagatgac ccagtctcca tc 42

<210> 124
<211> 26

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador MS-52

<400> 124
gaagaccgat ggccttgg tgctag 26

<210> 125
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador MS-55

<400> 125
gcaacatatg ttgaagagtt taaggacgg 30

<210> 126
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> MS-56

<400> 126
atgaactggg tgcgacaggc ccctg 25

<210> 127
<211> 56
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-679

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(28)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)

<223> w is a or t

<400> 127
caggggctg tcgacccag ttcattmnnaw actcagtgaa ggtgatcca gaagcc 56

<210> 128
<211> 81
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-680

<400> 128
ccgtccctta aactctcaa cataggtgc ctctccagtt ttggtgtta tccatccat 60
ccactcaagc cctgtccag g 81

<210> 129
<211> 50
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-685

<400> 129
cagctatgac catgattacg ccaagctgc atgcaaattc tattcaagg 50

<210> 130
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-686

<400> 130
gttgctggt atcagcagaa accaggg 27

<210> 131
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-687

<400> 131
gctcttgtg acgggcgagc tcaggccctg atgg 34

333972.TXT

<210> 132
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-688

<400> 132
ggagtcccat caaggttcag tggcagtga tctgg 35

<210> 133
<211> 70
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-681

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

<210> 134
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-682

<400> 134
ctgccactga acctgatgg gactccactg tagcggtagg atgccgaata gatcaggagc 60
ttaggtgctt tccctgg 77

<210> 135
<211> 64
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC7

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature

333972.TXT

<222> (38)..(39)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 135
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaagtcmmnt ctgcacagt aatacacggc 60 ,
agtg 64

<210> 136
<211> 64
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC8

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 136
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaamnnccat ctgcacagt aatacacggc 60
agtg 64

<210> 137
<211> 64
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC9

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 137
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata mnngtcccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg

64

<210> 138
<211> 64
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC10

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 138
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcmnn gaagtcccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg

64

<210> 139
<211> 64
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC11

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 139
ccagtagtcc atagcctcca cgtamnnata gaagtcccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg

64

<210> 140
<211> 64
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador AC12

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> m is a or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 140

cgtggtcct tggccccagt agtccatagc ctccacmnna tcatagaagt cccatctgc 60

acag

64

<210> 141

<211> 64

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador AC13

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> m is a or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 141

cgtggtcct tggccccagt agtccatagc ctcnnngtaa tcatagaagt cccatctgc 60

acag

64

<210> 142

<211> 64

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador AC14

333972.TXT

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 142
cgtggtccct tggccccagt agtccatagc mnnacgtaa tcatagaagt cccatctgc 60
acag 64

<210> 143
<211> 64
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC15

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 143
cgtggtccct tggccccagt agtccatmnn ctccacgtaa tcatagaagt cccatctgc 60
acag 64

<210> 144
<211> 64
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC16

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> m is a or c

<220>

333972.TXT

<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 144
cgtggtcctt tggccccagt agtcmnnagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60
acag 64

<210> 145
<211> 77
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC17

<400> 145
cgtggtcctt tggccccagt agtccatagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60
acagtaatac acggcag 77

<210> 146
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-749

<400> 146
ccatcagggc ctgagctcgc ccgtc 25

<210> 147
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-750

<400> 147
cgtggaggct atggactact ggggccaagg 30

<210> 148
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-751

<400> 148
gactactggg gccaaaggac cacggcac

29

<210> 149
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-752

<400> 149
ggtcaggcg cctgagttcc acg

23

<210> 150
<211> 60
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC1

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(39)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 150
ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggata ggtgtamnt tggtagacgt agtaagttgc 60

<210> 151
<211> 60
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC2

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 151

ggtgccctgg ccaaactga atagaggata ggtmnnatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 152

<211> 60

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador AC3

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> m is a or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 152

ggtgccctgg ccaaactga atagaggata mnngtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 153

<211> 60

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador AC4

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> m is a or c

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 153

ggtgccctgg ccaaactga atagaggmnn ggtgtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 154

<211> 60

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador AC5

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> m is a or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(24)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 154
ggtgccctgg ccaaacgtga amnnaggata ggtgtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 155
<211> 60
<212> DNA
<213> Secuencia Artificials

<220>
<223> Cebador AC6

<400> 155
ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggata ggtgtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 156
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EAB-746

<400> 156
cgcttgatct cgagcttggg gccctggcca aacgtg 36

<210> 157
<211> 0
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> EN BLANCO

<400> 157
000

<210> 158
<211> 428

333972.TXT

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pETR6592

<400> 158

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 159
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> PMS22

<400> 159
 caggtgcaat tggcgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcttgaagg ctctggata caccttact gagttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gtgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 160
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador 1C8

<400> 160
 caggtgcaat tggcgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcttgaagg ctctggata caccttact gagttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gtgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatcatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 161
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

333972.TXT

<220>

<223> 3E1

<400> 161

caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttcgtggatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 162

<211> 363

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 2D7

<400> 162

caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctattggt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 163

<211> 363

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 163

caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

333972.TXT

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gtgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttgtctatt acttccagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 164
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 164
 caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gtgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttgcctatt acttccagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 165
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 165
 caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gtgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 ttgcgtatt acctgaggc tatggactac tggggccaag ggaccacgat caccgtctcc 360

333972.TXT

tca

363

<210> 166
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H3 Full (5) 19

<400> 166
caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg ctctggata caccttact gagttggaa tgagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac 300
gcctttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 167
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H3 Full (5) 8

<400> 167
caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg ctctggata caccttact gagttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
ttctttgagt atttaagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 168
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H3 Full (5) 28

<400> 168

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttttttatt acgtgcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 169

<211> 363

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H3 Full (5) 27

<400> 169

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300

ttttttatt acgttgaggc gatggactac tggggccaag ggaccacagt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 170

<211> 363

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H4E9 Cadena Pesada

<400> 170

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

333972.TXT

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaatacca aaactggaga ggcaacttat 180
 attgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 171
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> pAC14 (B9)

<400> 171
 caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctctggata caccttact gatttggtg tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaagtggaga ggcaacctat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 172
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> pAC15 (F9)

<400> 172
 caggtgcaat tgggtcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg ctctggata caccttact gatttggtg tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

333972.TXT

tca

363

<210> 173
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H1/H2 (5) 2

<400> 173
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggt 60
tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gattattcta tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatac ataaacacca aaaatggaga ggcaaacat 180
gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 174
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H1/H2 (5) 11

<400> 174
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggt 60
tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gattatggtg tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaaatggaga ggcaacctat 180
attgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca

363

<210> 175
<211> 363
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

333972.TXT

<220>

<223> H1/H2 (5) 13

<400> 175

caggtgcaat tggcgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatataaatacaccaaaaatggaga ggcaaactat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggacg cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 176

<211> 363

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 14

<400> 176

caggtgcaat tggcgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtatgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatataaatacaccaaaaatggaga ggcaaactat 180

gttgaagagt ttaagggacg gttgtcttc tcctggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 177

<211> 363

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H3 Full (5) 19

<400> 177

caggtgcaat tggcgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg ctctggata caccttcaact gagtttgga tgagctgggt gcgacaggcc 120

333972.TXT

cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gttgtctc tcttgaca cctctgcag caggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtg attactgtc gagatgggac 300
 gccttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacgt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 178
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> pAC21 (3A1)

<400> 178
 gatatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcactgca aggccagtc caatgtggg aataatgtg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctct gatctattg gctccaacc gctccgttg agtcccatca 180
 aggttcagt gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cagtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 179
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> pAC19 (2C6)

<400> 179
 gatatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcactgca aggccagtaa gaatgtggg actaatgtg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagccct gatctacct gcatcctacc ccagattgg agtcccatca 180
 aggttcagt gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcccctatt cagtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

333972.TXT

<210> 180
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> pAC18 (2F1)

<400> 180
 gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc ggctgtgggt acgtatgttg cgtgggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 181
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> pAC23 (2F11)

<400> 181
 gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc gatagcgagt actaatgttg cctgggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattgg gcatcctacc gctatagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 182
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> H4E9 Cadena Ligera

<400> 182
 gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgttg cctgggatca gcagaaacca 120

333972.TXT

gggaaagcac ctaagcccct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 183
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> L2D2

<400> 183
 gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc caatgtgggt accaacgttg cgtggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcccacc ggtacagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 184
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> pAC6 (C1)

<400> 184
 gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc gattatgggt cctaagtgtg cgtggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc acgaaagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 185
 <211> 330

333972.TXT

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC7 (E10)

<400> 185
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc aattgtgggt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatccacc gtccagtggt agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 186
<211> 330
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC12 (H7)

<400> 186
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc gaagggtcct actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc gctacagtggt agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 187
<211> 330
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC13 (H11)

<400> 187
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc gactgtgagt gctaattgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcatcctacc gctacagagg agtcccatca 180

333972.TXT

aggtcagtg gcagtggaac tgggacagat ttaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 188
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PMS22

<400> 188

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 189
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

Página 67

<223> 1C8

<400> 189

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 190

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 3E1

<400> 190

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 191

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 2D7

<400> 191

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

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 192
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 192

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 193
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 193

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 194
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 194

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 195

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H3 Full (5) 19

<400> 195

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

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

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

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

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

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

Página 72

333972.TXT

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 196
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H3 Full (5) 8

<400> 196

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 197
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H3 Full (5) 28

<400> 197

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 198

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H3 Full (5) 27

<400> 198

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 199

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H4E9 Cadena Pesada

<400> 199

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

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 200
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC14 (B9)

<400> 200

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 201
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pAC15 (F9)

<400> 201

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 202

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 2

<400> 202

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 203

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H1/H2 (5) 11

<400> 203

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

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 204
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H1/H2 (5) 13

<400> 204

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 205
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

333972.TXT

<223> H1/H2 (5) 14

<400> 205

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 206

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H3 Full (5) 19

<400> 206

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

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

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

333972.TXT

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 207
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC21 (3A1)

<400> 207

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

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

<210> 208
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC19 (2C6)

<400> 208

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

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

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

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

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

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

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

<210> 209
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC18 (2F1)

<400> 209

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

333972.TXT

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

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

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

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

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

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

<210> 210

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pAC23 (2F11)

<400> 210

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

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

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

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

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

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

333972.TXT

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

<210> 211
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H4E9 Cadena Ligera

<400> 211

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

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

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

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

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

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

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

<210> 212
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> L2D2

<400> 212

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

Página 84

333972.TXT

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

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

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

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

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

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

<210> 213
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC6 (C1)

<400> 213

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

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

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

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

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

Página 85

333972.TXT

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

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

<210> 214
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC7 (E10)

<400> 214

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

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

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

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

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

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

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

<210> 215
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAC12 (H7)

<400> 215

333972.TXT

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

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

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

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

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

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

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

<210> 216

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pAC13 (H11)

<400> 216

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

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

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

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

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

Página 87

333972.TXT

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

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



No. 12-014021- -00000-0000

Fecha: 2012-01-30 16:41:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Follos: 257

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que solicita una patente
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art .33 Decisión 486/00, Circular Única**

- 1 ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - 31 ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resume)
 - 154 ☒ Dibujos de ser estos pertinentes.
 - 2 ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación grafica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐