Industria y C...
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-166350- -00000-0000
Fecha: 2013-07-12 16:59:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"ANTICUERPOS DEL CEA"**

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. 12 JUL. 2013

(FORMA P 10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-166350- -00000-0000
Fecha: 2013-07-12 16:59:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/EP2012/053390	Fecha	29/02/12
Publicación Internacional No.	WO 2012/117002 A1	Fecha	07/09/12

3 (54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:

"ANTICUERPOS DEL CEA"

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP

C07K 16/30

5 (71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
4.	**ROCHE GLYCART AG**			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Suiza.	No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD	Schlieren	E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Suiza
PAÍS DE RESIDENCIA	Suiza		

7 (72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	HOFER	Thomas U.	Suiza
2.	HOSSE	Ralf	Alemania
3.	MOESSNER	Ekkehard	Alemania
4.	UMANA	Pablo	Costa Rica

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Suiza		Zuerich	1. Alte Muehlackerstrasse 50, CH-8046 Zuerich, Suiza.
		Cham	2. Schmiedstrasse 8, CH-6330 Cham, Suiza.
		Kreuzlingen	3. Felsenburgweg 5, CH-8280 Kreuzlingen, Suiza.
		Wollerau	4. Felsenrainstrasse 28, CH-8832 Wollerau, Suiza.

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 (74) ☒ **REPRESENTANTE** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE	ALICIA	C.C 39.690.713 T.P .53.215

DIRECCIÓN	Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD	Bogotá	E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS	Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
	1. Oficina Europea de Patentes	EP	11156665.9	11/03/02

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

14 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO N° 13-0065226 **Fecha** 02-07-2013

15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante

C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado

16 ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción N° de folios: 99
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 45
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 41
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☒ Arte final 12 x 12.
8. ☒ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.
14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales a 10.

VER ANEXO CD

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 13 / 07 / 12 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
2020		3

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	13-166350-	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	**Otro**
Item	***Soporte Documental***
X 7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	**Otro**

Observaciones:

folio 3 CD

CE

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0065226

Bogotá D.C., Julio 02 de 2013 - 15:03:42

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	561170304	02/07/2013	17.425.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

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

Responsable: _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-166350- -00000-0000
Fecha: 2013-07-12 16:59:25 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-166350- -00000-0000

Fecha: 2013-07-12 16:59:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se 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 el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ 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 DE 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 gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

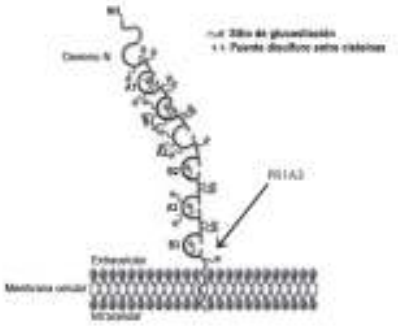


Fig. 1

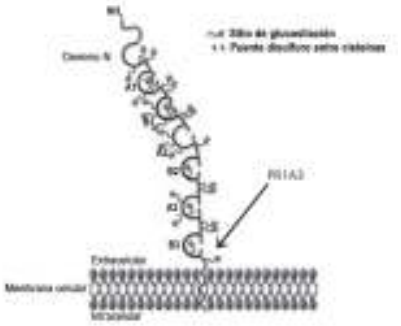


Fig. 1

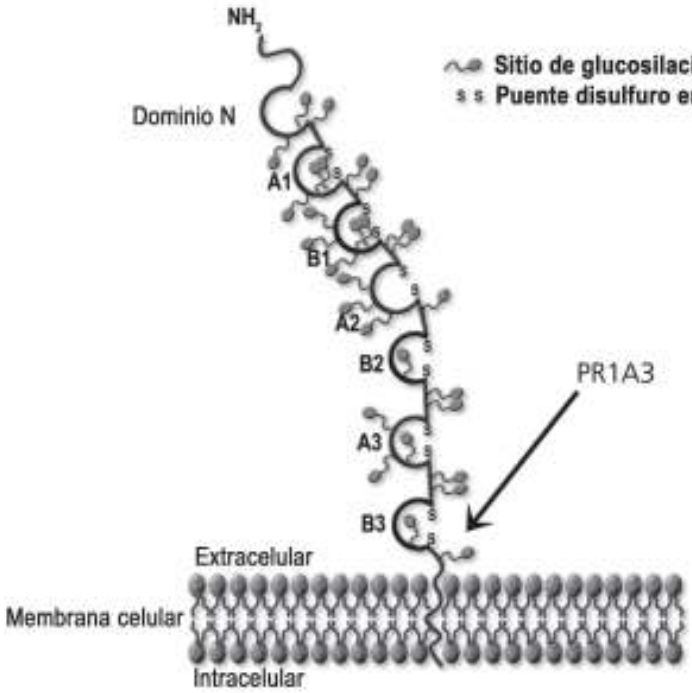


Fig. 1

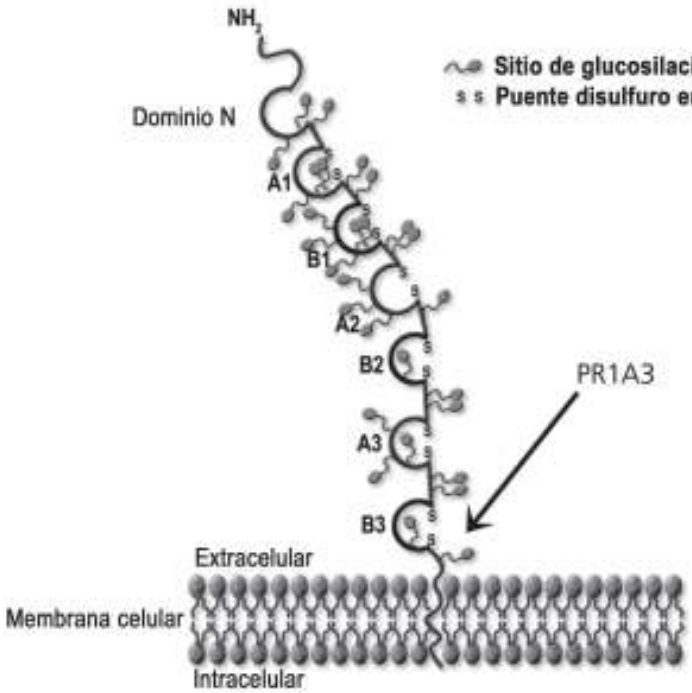


Fig. 1

ANTICUERPOS DEL CEA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno (ABMs) que se unen a CEA unido a membrana, incluyendo ABMS con propiedades terapéuticas mejoradas, y métodos de utilización de las mismas.

Sector: Biotecnología, específicamente anticuerpos monoclonales recombinantes incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados que se unen al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y composiciones que los contienen, útiles para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama.

ANTICUERPOS DEL CEA

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente europea nº 11156665.9, presentada el 2 de marzo de 2011, la exposición de la cual se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] 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 que se unen al antígeno carcinoembrionario humano (CEA).

ANTECEDENTES

El antígeno carcinoembrionario (CEA) y los anticuerpos anti-CEA

[0003] El antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CEACAM-5 ó CD66e) es una glucoproteína que presenta un peso molecular de aproximadamente 180 kDa. El CEA es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y contiene siete dominios que se unen 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 N-terminal de Ig y seis dominios (A1-B1-A2-B2-A3-B3) homólogos del dominio constante de Ig (Hefta L.J. *et al.*, Cancer Res. 52:5647-5655, 1992).

[0004] La familia del CEA humano contiene 29 genes, de los cuales se expresan 18:7 pertenecen al subgrupo del CEA y 11, al subgrupo de las glucoproteínas específicas del embarazo. Se cree que varios miembros del subgrupo del 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 con el CEA, puede resultar difícil cultivar anticuerpos anti-CEA que sean específicos del CEA con reactividad cruzada mínima con otras proteínas estrechamente relacionadas.

[0005] Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que el CEA es un antígeno asociado a tumores (Gold y Freedman, J. Exp. Med. 121:439-462, 1965; Berinstein N.L., J. Clin. Oncol. 20:2197-2207, 2002). Originalmente clasificado como proteína expresada únicamente en tejido fetal, ahora se ha identificado que el CEA se encuentra presente en varios tejidos adultos normales. Estos tejidos principalmente son 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).

[0006] Los tumores de origen epitelial, así como sus metástasis, contienen CEA como antígeno asociado a tumor. Aunque la presencia misma de CEA no implica transformación en una célula cancerosa, la distribución del CEA es indicativa. En el tejido normal, el CEA generalmente se expresa sobre la superficie apical de la célula (Hammarström S., Semin. Cancer Biol. 9(2):67-81, 1999), provocando que resulte inaccesible a anticuerpos en el flujo sanguíneo. En contraste con el tejido normal, el CEA tiende a expresarse en toda la superficie de las células cancerosas (Hammarström S., Semin. Cancer Biol. *9*(2):67-81 (1999)). Este cambio del patrón de expresión provoca que el CEA resulte accesible a la unión de anticuerpos en las células cancerosas. Además, se incrementa la expresión del CEA en las células cancerosas. Adicionalmente, la expresión incrementada de CEA induce un incremento de las adhesiones intercelulares, que pueden conducir a la metástasis (Marshall J., Semin. Oncol. 30(a, supl. 8):30-6, 2003).

[0007] El CEA resulta fácilmente escindido de la superficie celular, liberándose en el flujo sanguíneo a partir de tumores, directamente o mediante el sistema linfático. Debido a dicha propiedad, el nivel de CEA sérico ha sido utilizado como marcador clínico para el diagnóstico de cánceres y el cribado para la recurrencia de algunos cánceres, en particular el cáncer colorrectal (Goldenberg D.M., The International Journal of Biological Markers 7:183-188, 1992; Chau I. *et al.*, J. Clin. Oncol. 22:1420-1429, 2004; Flamini *et al.*, Clin. Cancer Res. 12(23):6985-6988, 2006). Esta propiedad también supone uno de los retos de la utilización del CEA como diana, debido a que el CEA sérico se une a la mayoría de los anticuerpos anti-CEA disponibles actualmente, dificultando que alcance su diana sobre la superficie celular y limitando los potenciales efectos clínicos.

[0008] Se han preparado 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).

[0009] Chester *et al.* han aislado un anticuerpo anti-CEA de una sola cadena a partir de una biblioteca de expresión fágica para su utilización en la radioinmunodetección y radioinmunoterapia (patente US nº 5.876.691) y posteriormente se humanizó el anticuerpo (patente US nº 7.232.888). También se han aislado anticuerpos anti-CEA a partir de bibliotecas humanas de expresión fágica (patente US nº 5.872.215). Se preparó el anticuerpo monoclonal de ratón PR1A3 mediante 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 los carcinomas colorrectales, tanto los bien diferenciados como los pobremente diferenciados, y presenta ventajas respecto a otros anticuerpos reactivos con el epitelio colorrectal debido a que su antígeno aparentemente se encuentra fijo en los tumores y no aparece en el sistema linfático 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 únicamente con 75% de los tumores colorrectales (Mansi L. *et al.*, Int. J. Rad. Appl. Instrum. B 16(2):127-35, 1989).

[0010] El mapeado de epítopos de PR1A3 demostró que el anticuerpo presenta como diana 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 esta propiedad de unión, es improbable que el anticuerpo PR1A3 resulte secuestrado por el CEA sérico; por el contrario, puede presentar como diana CEA

expresado sobre células cancerosas. El epítopo unido a PR1A3 es un epítopo conformacional, no un epítopo lineal, que se cree contribuye a la pérdida de la unión de PR1A3 al CEA soluble (Stewart *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-06, 1999).

[0011] El anticuerpo PR1A3 fue humanizado previamente mediante injertación de las CDRs del anticuerpo parental murino en las regiones 1 a 3 del marco de la cadena pesada del anticuerpo humano RF-TS3'CL (que conserva el marco murino 4 de PR1A3) y las regiones del marco de la cadena ligera del anticuerpo REI (Stewart *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-06, 1999). Esta versión humanizada de PR1A3 conservaba especificidad para el CEA expresado en superficie con una afinidad similar a la del anticuerpo murino (Stewart *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-06, 1999; patente US nº 5.965.710). Se demostró que un anticuerpo PR1A3 humanizado (PR1A3h) inducía la eliminación dirigida de las líneas celulares de cáncer colorrectal (Conaghhan P.J. *et al.*, Br. J. Cancer 98(7):1217-1225). Sin embargo, la afinidad de PR1A3h para CEA es relativamente baja.

[0012] Los anticuerpos anti-CEA marcados radioactivamente han sido utilizados en ensayos clínicos en pacientes con cáncer colorrectal. Por ejemplo, se ha utilizado el minicuerpo quimérico T84.66 (cT84.66) marcado con ^{123}I en un estudio clínico piloto de pacientes con cáncer colorrectal. El minicuerpo marcado radioactivamente logró dirigirse a las células diana de cáncer (Wong J.Y. *et al.*, Clin. Cancer Res. 10(15):5014-21, 2004). En otro ejemplo, se sometió a ensayo labetuzumab-^{131}I, un anticuerpo anti-CEA humanizado marcado radioactivamente, en radioinmunoterapia de 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

[0013] 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 N. *et al.*, Nature Biotechnol. 14:975-81, 1996).

[0014] Las células de mamífero son los huéspedes preferentes para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glucosilar proteínas de la manera más compatible para la aplicación en el ser humano (Cumming *et al.*, Glycobiology 1:115-30, 1991; Jenkins N. *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 medio libre 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 de animales transgénicos (Jenkins *et al.*, Nature Biotechnol. 14:975-81, 1996).

[0015] 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 pueden encontrarse en 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.

[0016] Una manera de obtener grandes incrementos de potencia, manteniendo simultáneamente un procedimiento simple de producción y potencialmente evitando 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 se describe en Umaña P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y en la patente WO nº 6.602.684, el contenido completo de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos utilizados más comúnmente en la inmunoterapia del cáncer, son glucoproteínas que presentan un sitio de glucosilación N-ligada conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn27 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)).

[0017] Umaña *et al.* han demostrado anteriormente que la sobreexpresión de la β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados 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 Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180,

1999, y la publicación de patente internacional WO nº 99/54342, el contenido completo de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de mAbs no conjugados que presentan una elevada afinidad y especificidad tumorales, pero que presentan demasiada poca potencia para resultar clínicamente útiles en el caso de que se produzcan en líneas celulares industriales estándares, que no presentan el enzima GnTIII (Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. *17*:176-180, 1999). Este estudio fue el primero que demostró que podían obtenerse grandes incrementos de la actividad de ADCC mediante la manipulación de las células productoras de anticuerpos para que produjesen GnTIII, lo que también conducía a un incremento de la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos no fucosilados bisectados, por encima de los niveles observados en anticuerpos naturales.

[0018] Sigue existiendo una necesidad de enfoques terapéuticos mejorados con diana en CEA, en particular CEA unido a membrana, para el tratamiento de cánceres.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0019] Un aspecto de la invención proporciona una molécula variante de unión a antígeno (ABM), tal como un anticuerpo, que se une al antígeno carcinoembrionario (CEA) unido a membrana. En una realización, la ABM presenta una estabilidad incrementada comparado con su molécula parental. En una realización, la ABM presenta una estabilidad incrementada y mantiene su afinidad de unión, o presenta una afinidad de unión mejorada, para el CEA unido a membrana en comparación con su molécula parental. En una realización, la ABM es estable a una temperatura que es por lo menos 0,5, 1,0, 1,5 ó 2,0 grados centígrados más alta que la de su molécula parental. En una realización, el incremento de estabilidad se mide utilizando un ensayo de dispersión lumínica dinámica. En algunas realizaciones, la molécula parental de comparación es el anticuerpo PR1A3 ó la versión humanizada del anticuerpo PR1A3. En una realización, la molécula parental de comparación es una versión humanizada del anticuerpo PR1A3 que comprende la región variable de cadena pesada CH7A (SEC ID nº 101) y la región variable de cadena ligera 2F1

(SEC ID nº 209). En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es estable a 67 grados centígrados o más alta, según mediciones mediante, por ejemplo, un ensayo de dispersión lumínica dinámica. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno se une a CEA unido a membrana a una K_d de 100 nM o inferior. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno se une a CEA unido a membrana a una K_d de 10 nM o inferior.

[0020]

[0021] En una realización, la ABM comprende una región variable de cadena pesada que comprende una 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 y SEC ID nº 12, una 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 una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224. En una realización, la ABM comprende una región variable de cadena ligera que comprende una 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, y una CDR2 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 una CDR3 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 56. En otra realización, la región variable de cadena pesada de la ABM comprende la CDR1 de cadena pesada de secuencia SEC ID nº 1, la CDR2 de cadena pesada de secuencia SEC ID nº 13, una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224, y la región variable de cadena ligera de la ABM comprende la CDR1 de cadena ligera de SEC ID nº 39, la CDR2 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 49, y la CDR3 de cadena ligera de secuencia SEC ID nº 56. En una realización adicional, la ABM comprende los residuos de marco de CH1A1A (SEC ID nº 261) o CH1A1B (SEC ID nº 262).

[0022] En una realización, la región variable de cadena pesada de la ABM comprende una secuencia de amioácidos que es por lo menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243, y SEC ID nº 247 y la región variable de cadena ligera de la ABM comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la secuencia SEC ID nº 209. En una realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de la ABM que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo de SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243, y SEC ID nº 247, y una región variable de cadena ligera de la ABM que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 209. En algunas realizaciones, la ABM comprende una región Fc, por ejemplo una región Fc de IgG humana. En determinadas realizaciones, la ABM es un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como un anticuerpo completo, un fragmento scFv, un fragmento Fv, un fragmento F(ab')2, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo o un tetracuerpo.

[0023] Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a CEA unido a membrana, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID n3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 y SEC ID nº 12, una 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 una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224.

[0024] En una realización, el anticuerpo presenta una estabilidad incrementada comparado con su molécula parental. En una realización, el anticuerpo es estable a una temperatura que es por lo menos 0,5, 1,0, 1,5 ó 2,0 grados centígrados más alta que la de su molécula parental. En una realización, el incremento de estabilidad se mide utilizando un ensayo de dispersión lumínica dinámica. En algunas realizaciones, la molécula parental de comparación es el anticuerpo PR1A3

ó la versión humanizada del anticuerpo PR1A3. En una realización, la molécula parental de comparación es una versión humanizada del anticuerpo PR1A3 que comprende la región variable de cadena pesada CH7A (SEC ID nº 101) y la región variable de cadena ligera 2F1 (SEC ID nº 209). En una realización, el anticuerpo es estable a 67 grados centígrados o a una temperatura superior, según mediciones mediante, por ejemplo, un ensayo de dispersión lumínica dinámica. En una realización, el anticuerpo se une a CEA unido a membrana a una Kd de 100 nM o inferior. En una realización, el anticuerpo se une a CEA unido a membrana a una Kd de 10 nM o inferior.

[0025] En una realización, el anticuerpo también comprende una región variable de cadena ligera que comprende una 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, y una CDR2 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 una CDR3 de cadena ligera de SEC ID nº 56. En una realización, la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID nº 1, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID nº 13, una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219 SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224; y la región variable de cadena ligera del anticuerpo que comprende la CDR1 de cadena ligera de SEC ID nº 39, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID nº 49, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID nº 56. En uan realización adicional, el anticuerpo comprende los residuos de marco de CH1A1A (SEC ID nº **261) o CH1A1B (SEC ID nº 262).** En una realización, la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de amioácidos que es por lo menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243, y SEC ID nº 247 y la región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la secuencia SEC ID nº 209. En una realización, la región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el

grupo de SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243, y SEC ID nº 247, y una región variable de cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 209.

[0026] En determinadas realizaciones, la ABM o anticuerpo de las realizaciones anteriormente indicadas se une al mismo epítopo, o es capaz de competir para la unión con el mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3.

[0027] En una realización, la ABM o el anticuerpo comprende una región Fc que ha sido glucomanipulada. En una realización, por lo menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de los oligosacáridos N-ligados en la región Fc del anticuerpo glucomanipulado son no fucosilados. En una realización, por lo menos aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de los oligosacáridos N-ligados en la región Fc glucomanipulada son bisectados. En una realización, por lo menos aproximadamente 20% a aproximadamente 50% de los oligosacáridos N-ligados en la región Fc glucomanipulada son bisectados no fucosilados. En una realización, la ABM o anticuerpo glucomanipulado presenta por lo menos una función efectora incrementada. La función efectora incrementada es, por ejemplo, una afinidad de unión a receptor Fc incrementada, una citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) incrementada, una unión a células NK incrementada, una unión a macrófagos incrementada, una unión a monocitos incrementada, una unión a células polimorfonucleares incrementada, señalización directa inductora de apoptosis, maduración de células dendríticas incrementada y cebado de células T incrementado. En una realización, la ABM o anticuerpo glucomanipulado presenta un incremento de la ADCC de por lo menos aproximadamente 40% a aproximadamente 100% en comparación con la molécula de unión a antígeno parental no glucomanipulada.

[0028] Otro aspecto de la invención proporciona un polinucleótido aislado codificante de la ABM o anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas. Otro aspecto de la invención proporciona un polinucleótido aislado codificante de la ABM o anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas. Otro aspecto de la invención proporciona una célula huésped que comprende dicho vector.

[0029] Otro aspecto de la invención proporciona una composición que comprende la ABM o anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0030] Otro aspecto de la invención proporciona un método para inducir la lisis celular de una célula tumoral, que comprende poner en contacto la célula tumoral con la ABM o anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas. En algunas realizaciones, la célula tumoral es una célula de cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), célula de cáncer gástrico, célula de cáncer pancreático o células de cáncer de mama. En una realización, la lisis celular se induce mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de la ABM o anticuerpo.

[0031] Otro aspecto de la invención proporciona un método de tratamiento de un sujeto que presenta un cáncer que expresa anormalmente CEA, comprendiendo el método la administración en el sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de la ABM o anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas.

[0032] Otro aspecto de la invención proporciona un método de incrementar el tiempo de supervivencia en un sujeto que presenta un cáncer que expresa anormalmente CEA, comprendiendo el método la administración en dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de la ABM o anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas. En una realización, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama.

[0033] En determinadas realizaciones de estos métodos, la ABM, anticuerpo o composición se administra en combinación con quimioterapia o terapia de radiación. En una realización, el sujeto es un ser humano.

[0034] Otro aspecto de la invención proporciona la utilización de la ABM o anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto que presenta un cáncer que expresa anormalmente CEA. En una realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0035] La FIGURA 1 muestra un diagrama esquemático del antígeno CEA (CEACAM-5, CD66e). El anticuerpo PR1A3 se une específicamente al dominio B3 del antígeno en el caso de que se una a la membrana celular.

[0036] La FIGURA 2 muestra la actividad ADCC incrementada de un anticuerpo PR1A3 quimérico glucomanipulado en comparación con anticuerpo PR1A3 quimérico no glucomanipulado con PBMCs humanas como efectoras.

[0037] 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, en comparación con el anticuerpo PR1A3 quimérico.

[0038] La FIGURA 4 muestra los sitios de aleatorización para generar una biblioteca de anticuerpos para la maduración de afinidad de la cadena ligera del anticuerpo PR1A3 humanizado. Se aleatorizaron las posiciones marcadas con una X.

[0039] La FIGURA 5 muestra los sitios de aleatorización para generar una biblioteca de anticuerpos para la maduración de afinidad de la cadena pesada del anticuerpo PR1A3 humanizado. Se aleatorizaron las posiciones marcadas con una X.

[0040] La FIGURA 6 muestra la actividad de unión de los 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.

[0041] La FIGURA 7 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg que recibieron la administración por vía intraesplénica de células del carcinoma colorrectal humano LS174T con el fin de crear un modelo de tumor ortotópico. Se inicio la terapia de anticuerpos siete días después mediante inyección de los anticuerpos a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal, seguido de dos inyecciones por semana 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 generado previamente. "GA201" representa un anticuerpo anti-EGF humanizado utilizado a modo de control positivo. "PBS" se refiere a una solución salina tamponada con fosfato, que se utilizó a modo

de control negativo. Se estimó la supervivencia según los criterios de terminación definidos por la autoridad reguladora suiza.

[0042] 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 donde se injertaba el tumor en el pulmón de los animales. Se inicio la terapia de anticuerpos siete días después mediante inyección de los anticuerpos a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal, seguido de dos inyecciones por semana adicionales. "CH7A", "SM3E" y "GA201" son tal como se indica en la figura 7, anteriormente. La denominación "CH7 ArF9 CL1A rH11" representa una variante del anticuerpo CH7A con cadenas pesada y ligera de afinidad madurada. La denominación "ge" indica que el anticuerpo ha sido glucomanipulado para que presente u número reducido de oligosacáridos fucosilados en la región Fc. El término "vehículo" se refiere al control negativo. Las células de carcinoma pulmonar A549 son fuertemente positivas para la expresión de EGFR y débilmente positivas para la expresión de CEA.

[0043] La FIGURA 9 muestra los resultados de un estudio de eficacia en ratones SCID/bg que recibieron una inyección intraesplénica de 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 tal como se ha indicado en las figuras 7 y 8, anteriormente.

[0044] La FIGURA 10 muestra el análisis cinético de los clones de afinidad madurada: (a) muestra un sensograma 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 las mismas, CH7A H4E9 y CL1A pAC18 (SEC ID nº 199 y nº 209); (b) resumen del análisis cinético de los clones de afinidad madurada.

[0045] La FIGURA 11 muestra una visión general esquemática de la estrategia de PCR de la aleatorización de CDR1 y CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-CEA CH7A humanizado.

[0046] La FIGURA 12 muestra una visión general esquemática de la estrategia de PCR de la aleatorización de CDR1 y CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-CEA CL1A humanizado.

[0047] La FIGURA 13 muestra una visión general esquemática de la estrategia de PCR de la aleatorización de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-CEA CH7A humanizado.

[0048] La FIGURA 14 muestra una visión general esquemática de la estrategia de PCR de la aleatorización de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-CEA CL1A humanizado.

[0049] La FIGURA 15 muestra la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CEA para CEA unido a membrana sobre células diana MKN45. Los anticuerpos anti-CEA humanizados con cadena ligera de afinidad madurada (panel A, CH7A, CL1ArH7 ó CH7A, CL1ArH11) o cadenas pesada y ligera de afinidad madurada (panel B, CH7A rB9, CL1A rH11 G2(1)) que han sido convertidos en IgG muestran una unión mejorada en comparación con el anticuerpo de control (CH7A, CL1A).

[0050] La FIGURA 16 muestra los resultados de un ensayo de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) con anticuerpos de afinidad madurada (CH7ArB9, CL1A rH11G2(1), CH7Arf9, CL1ArH11G2(1) y CH7A, CL1A rH11 G2(1)) en comparación con anticuerpos de control (CH7A, CL1A G2(R2)).

[0051] La FIGURA 17 muestra los resultados de un ensayo de unión celular para el anticuerpo anti-CEA con cadena pesada CH1A en comparación con el anticuerpo quimérico de ratón-humano chPR1A3.

[0052] La FIGURA 18 muestra los resultados de un ensayo de unión de anticuerpos anti-CEA con cadena pesada CH1A1, CH1A2, CH1A3 ó CH1A4 y cadena ligera 2F1.

[0053] La FIGURA 19 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad de anticuerpos anti-CEA con cadena pesada CH1A1, CH1A2, CH1A3 ó CH1A4.

[0054] La FIGURA 20 muestra el resultado de un análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de anticuerpos anti-CEA generados a partir de CH1A1.

[0055] La FIGURA 21 muestra el resultado de ensayos de unión celular de anticuerpos anti-CEA generados a partir de CH1A1.

[0056] La FIGURA 22 muestra mediciones de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la afinidad (medida en la forma bivalente) de anticuerpos anti-CEA de estabilidad manipulada en comparación con la cadena pesada de 5HFF12 parental.

[0057] Las FIGURAS 23 y 24 muestran los resultados de un ensayo de estabilidad para el anticuerpo de afinidad madurada 5HFF12 en comparación con su cadena pesada parental CH7A con las mutaciones puntuales individuales introducidas que se seleccionaron en 5HFF12.

[0058] La FIGURA 25 muestra el análisis de resonancia de plasmón superficial de las variantes combinadas de marco y CDR-H3.

[0059] La FIGURA 26 muestra la actividad ADCC de las variantes de marco basadas en CHA1A.

[0060] La FIGURA 27 muestra la actividad ADCC de las variantes de marco basadas en CHA1A.

[0061] La FIGURA 28 muestra la actividad ADCC de las variantes combinadas de marco y CDR-H3.

[0062] La FIGURA 29 muestra la actividad ADCC de las variantes combinadas de marco y CDR-H3.

[0063] La FIGURA 30 muestra la eficacia del anticuerpo anti-CEA glucomanipulado CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1 en un modelo de xenoinjerto de carcinoma colorrectal en ratones SCID transgénicos para el CD16 humano.

[0064] La FIGURA 31 muestra la eficacia del anticuerpo anti-CEA glucomanipulado CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1 en un modelo de xenoinjerto de carcinoma pulmonar A549 en ratones SCID transgénicos para el CD16 humano.

[0065] La FIGURA 32 muestra las secuencias de aminoácidos de las CDRs de las diversas ABMs anti-CEA.

[0066] La FIGURA 33 muestra las secuencias de aminoácidos de los constructos de cadena ligera de diversos ABMs anti-CEA.

[0067] La FIGURA 34A-C muestra las secuencias de aminoácidos de CDRs de cadenas pesada y ligera de afinidad madurada y afinidades de unión asociadas.

[0068] La FIGURA 35 muestra las constantes de afinidad para las diversas secuencias de anticuerpo de afinidad madurada.

[0069] La FIGURA 36 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR-H3 de diversas ABMs anti-CEA.

[0070] La FIGURA 37A-C muestra las secuencias de aminoácidos de VH de diversas ABMs anti-CEA.

[0071] La FIGURA 38 muestra las alineaciones de secuencia de aminoácidos de regiones VH de diversos anticuerpos anti-CEA de estabilidad madurada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

[0072] Los términos se utilizan en la presente memoria tal como se utilizan generalmente en la técnica, a menos que se definan de otro modo a continuación.

[0073] 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 a un antígeno específico. Más concretamente, tal como se utiliza en la presente memoria, una "*molécula de unión a antígeno que se une a antígeno carcinoembrionario (CEA) humano unido a membrana*" es una ABM que se une específciamente a CEA, más particualrmente a CEA de superficie celular o unido a membrana. La expresión "se une específicamente" se refiere a que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas.

[0074] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "*anticuerpo*" pretende incluir moléculas completas de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (por ejemplo biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpo que presentan una región Fc y que conservan la especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que conservan la especificidad de unión. También se encuentran comprendidos los fragmentos de anticuerpo que conservan la especificidad de unión, incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos de V_H, fragmentos de V_L, 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).

[0075] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*dominio de unión a antígeno*" se refiere a la parte de una molécula de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente, y es complementaria, a parte o la totalidad de un antígeno. En el caso de que el antígeno sea grande, una molécula de unión a antígeno podría sólo unirse a una parte particular del antígeno, denominándose a esta parte, epítopo. 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).

[0076] 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, que se une al mismo antígeno, preferentemente que se une al mismo epítopo, que el anticuerpo de referencia, y que presenta una afinidad más alta para el antígeno que para 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 epítopo que la molécula de unión a antígeno de referencia inicial.

[0077] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*afinidad de unión*" se expresa generalmente en términos de constantes de asociación o disociación de 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 afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de tasa, con la condición de que la proporción entre las constantes de tasa siga siendo la misma.

[0078] 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 define que se encuentra comprendida entre el residuo aminoácido en la posición Cys226 y el extremo carboxilo-terminal.

[0079] 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 delecionarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse según normas generales que es conocido de la técnica que presentan un efecto mínimo sobre la actividad (ver, por ejemplo, Bowie J.U. *et al.*, Science 247:1306-10, 1990).

[0080] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*CEA humana unida a membrana*" se refiere a un antígeno carcinoembrionario (CEA) humano que se une 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, bajo determinadas circunstancias, referirse a CEA que no se encuentra unido a la membrana de una célula, pero que ha sido construido para que conserve el epítopo al que se une el anticuerpo PR1A3. La expresión "*CEA soluble*" se refiere a antígeno carcinoembrionario humano que no se encuentra unido o que ha sido escindido de una membrana celular o de la superficie celular (por ejemplo una superficie de célula tumoral) y/o que, típicamente, no conserva el epítopo conformacional al que se une el anticuerpo PR1A3. El CEA soluble puede encontrarse, por ejemplo, en el flujo sanguíneo o linfático de un sujeto que presenta cáncer.

[0081] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*ninguna reactividad cruzada sustancial contra CEA soluble*" se refiere a que una molécula (por ejemplo una molécula de unión a antígeno) no reconoce o 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 entre menos de aproximadamente 10% y menos de aproximadamente 5% del 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% del CEA

soluble, y más preferentemente menos de aproximadamente 0,2% ó 0,1% del CEA soluble.

[0082] Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "*fusión*" y "*quimérico*", utilizados en referencia a polipéptidos tales como los 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 no antígeno pueden derivarse de una amplia diversidad de especies, incluyendo primates, tales como chimpancés y seres humanos. La región constante de la ABM quimérica generalmente es sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico generalmente comprende una secuencia que se deriva de un anticuerpo anti-CEA recombinante que presenta la secuencia de aminoácidos de la región variable del PR1A3 murino. Los anticuerpos humanizados son una forma particularmente preferente de anticuerpos de fusión o quimérico.

[0083] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "*humanizado*" se utiliza para referirse a una molécula ligante de antígeno derivada en parte de una molécula ligante de antígeno no humana, 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 el ser humano. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante diversos métodos (denominados en la presente memoria "*humanización*"), incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: (a) la injertación de los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas con el fin de generar anticuerpos quiméricos, (b) la injertación de únicamente las CDRs no humanas (por ejemplo la molécula donante de unión a antígeno) en regiones constantes y de marco (por ejemplo una molécula receptora de unión a antígeno) humanas con o sin retención 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, aunque "enmascarándolos" con una sección de tipo humano mediante sustitución de 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 tres regiones determinantes de complementariedad, o CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada una de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera 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 cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Puede encontrarse un comentario sobre los anticuerpos humanizados en, entre otras referencias, la patente US nº 6.632.927, y en la solicitud publicada de patente US nº 2003/0175269, ambas incorporadas como referencia en su totalidad en la presente memoria. La humanización también puede llevarse a cabo mediante el trasplante de CDRs truncadas que contienen únicamente 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 participan directamente en la interacción específica con el antígeno y/o que resultan necesarios para la unión específica de antígeno. En general, únicamente un quinto a un tercio de los residuos en una CDR dada participan en la unión a antígenos. Los residuos determinantes de especificidad en una CDR particular pueden identificarse mediante, por ejemplo, el cálculo de los contactos interatómicos a partir del modelado tridimensional y la determinación de la variabilidad de las 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 la presente memoria en su totalidad.

[0084] En algunos casos, los residuos de la 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 llevan a cabo para refinar adicionalmente la actividad 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, y típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones hipervariables corresponden a las de

una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FRs corresponden a 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).

[0085] 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.

[0086] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "*variante*" (o "*análogo*") se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido específicamente mencionado de la invención en inserciones, deleciones y sustituciones creadas utilizando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante. Concretamente, pueden sintetizarse variantes recombinantes codificantes de dichos polipéptidos o de polipéptidos similares, o seleccionarse mediante la utilización de 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 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, a fin de modificar características tales como las afinidades de unión a ligandos, las afinidades entre cadenas o la tasa de degradación/renovación.

[0087] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*molécula variante de unión a antígeno anti-CEA*" se refiere a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos respecto de una secuencia de aminoácidos de una molécula "parental" de unión a antígeno anti-CEA en virtud de la adición, deleción y/o sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la secuencia parental de anticuerpo. En una realización específica, la variante comprende una o más

sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables of 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 cinco 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 variante de unión a antígeno anti-CEA 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 con una identidad de secuencia 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 la secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los del anticuerpo parental, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia. 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 variante de unión a antígeno conserva la capacidad de unirse a CEA humano unido a membrana. En una realización, la ABM anti-CEA se une al mismo epítopo que la molécula parental de unión a antígeno. En una realización, la ABM anti-CEA compite para la unión a CEA humano unido a membrana con la molécula parental de unión a antígeno. En una realización, la ABM anti-CEA se une a CEA humano unido a membrana y no se una a CEA humano soluble. La ABM anti-CEA presenta propiedades que son superiores a las de la molécula parental de unión a antígeno. Por ejemplo, la variante puede presentar una mayor afinidad de unión, una estabilidad incrementada y/o una capacidad mejorada de inducir citotoxicidad celular mediada por anticuerpos *in vitro* e *in vivo*. En una realización, la ABM anti-CEA presenta una estabilidad incrementada y conserva o mejora la afinidad de

unión para CEA unido a membrana y conserva o mejora la capacidad de inducir citotoxicidad celular mediada por anticuerpos *in vitro* e *in vivo*.

[0088] Para analizar dichas propiedades, debe compararse de manera general 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 a 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 a una forma de longitud completa de la molécula parental de unión a antígeno. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno presenta por lo menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 veces más actividad biológica que la molécula parental de unión a antígeno. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es una variante de estabilidad manipulada que presenta una estabilidad incrementada en comparación con la molécula parental de unión a antígeno. La estabilidad puede someterse a ensayo mediante cualquier método conocido de la técnica y mediante los métodos descritos en la presente memoria, concretamente en los Ejemplos 3 a 6. En realizaciones específicas, la molécula variante de unión a antígeno presenta por lo menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 40, 50 ó 100 veces más estabilidad que la molécula parental de unión a antígeno.

[0089] En algunas realizaciones, la molécula variante de unión a antígeno muestra una estabilidad incrementada que se mide como un cambio en el parámetro de estabilidad en comparación con la molécula parental de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la molécula variante de unión a antígeno presenta un cambio en el parámetro de estabilidad de por lo menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 40, 50 ó 100 veces comparado con la unión del antígeno paretal. Un parámetro de estabilidad es, por ejemplo, la temperatura a la que la molécula variante de unión a antígeno se despliega o desnaturaliza, la presión a la que la molécula variante de unión a antígeno se despliega o desnaturaliza, o el tiempo necesario para desanturalizarse o desplegarse la molécula variante de unión a antígeno bajo condiciones diseñadas para inestabilizar la molécula variante de unión a antígeno. En una realización, el incremento de estabilidad se incrementa mediante un ensayo térmico de desnaturalización, por ejemplo mediante calorimetría de escaneo diferencial (DSC).

En una realización, el incremento de estabilidad se determina mediante un ensayo de desnaturalización química. En una realización, el incremento de estabilidad se determina mediante un ensayo de desnaturalización química. En otra realización, la estabilidad de la molécula variante de unión a antígeno se determina utilizando un ensayo de polarización de fluorescencia. En una realización, la estabilidad de la molécula variante de unión a antígeno se determina utilizando un ensayo de dispersión lumínica dinámica (DLS) (ver los Ejemplos y, por ejemplo, Nobbmann U. *et al.*, Biotech. Genetic Eng. Rev. 24:117-128, 2007). El ensayo DLS realiza un seguimiento de la integridad de una molécula, tal como un anticuerpo, en el que, en general, un incremento de la dispersión lumínica indica despligue o desnaturalización de la proteína. El ensayo DLS de las moléculas puede examinarse como función de la temperatura o desnaturalizantes químicos con el fin de comparar las estabilidades relativas. Aquellas moléculas que permanecen en su conformación nativa incremento reducido o nulo de las propiedades del ensayo DLS) se considera que son estables bajo las condiciones de ensayo. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es estable a una temperatura que es por lo menos 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ó 10,0 grados centígrados superior a la de la ABM parental, u otra molécula de referencia apropiada, al analizarse utilizando un ensayo de dispersión lumínica dinámica. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es estable a 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 grados centígrados o a una temperatura superior. La estabilidad térmica puede medirse, por ejemplo, utilizando un ensayo DLS, DSC o de polarización de fluorescencia. En una realización, la estabilidad térmica de la molécula variante de unión a antígeno se mide utilizando un ensayo DLS. En una realización, el ensayo DLS se llevó a cabo utilizando 1 mg/ml de la ABM o ABM variante en un tampón de histidina 20 mM y NaCl 140 mM, a pH 6,0. El ensayo DLS se lleva a cabo desde 25ºC, con un incremento por etapas de la temperatura de 0,05ºC/minuto.

[0090] El término "*parental*" referido a una 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, presenta

una o más regiones constantes de anticuerpo humanas. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

[0091] 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 conservadoras de aminoácidos. Pueden realizarse sustituciones "conservadoras" de aminoácidos basándose en similitudes de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o la 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 cargados positivamente (básicos) se incluyen arginina, lisina e histidina; y entre los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) se incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las "*inserciones*" o "*deleciones*" generalmente son de entre aproximadament 1 y aproximadamente 20 aminoácidos, más concretamente de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 aminoácidos, y todavía más concretamente, de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 aminoácidos. Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de dichas clases por uno de otra clase. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos también pueden 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 realizando sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en una molécula de polipéptido utilizando técnicas de ADN recombinante y sometiendo a ensayo las variantes recombinantes que resultan para su actividad.

[0092] 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 en forma de una única cadena polipeptídica. Típicamente, los dominios de VH y de VL se unen mediante una secuencia conectora. Ver, por ejemplo, Pluckthun, en: The PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113,

Rosenburg and Moore, editores, Springer-Verlag, New York, páginas 269 a 315, 1994.

[0093] 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 región de dimerización. Generalmente, la región constante se conecta al scFv mediante una región bisagra y/o una región conectora. Pueden encontrarse ejemplos de proteínas minicuerpo en Hu *et al.* Cancer Res. 56: 3055-61, 1996.

[0094] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "*diacuerpo*" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectados a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un conector 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, creando dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen en mayor detalle en, por ejemplo, las patentes EP nº 404.097, 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, resultando en cuatro sitios de unión.

[0095] En el caso de que existan dos o más defiiciones 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 sigificados, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es la utilización de la expresión “región determinante de complementariedad” (“CDR”) para referirse a 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 pesados como ligeros. Las CDRs también se denominan "regiones hipervariables" y esta expresión se utiliza intercambiablemente en la presente memoria con el término "CDR" en referencia a las 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", 1986, y por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987, incorporándose como referencia en la presente memoria, en las que las definiciones incluyen residuos aminoácidos solapantes o subconjuntos de aminoácidos al compararlas 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 uan 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 CDR[1]

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

[1]La 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.

[0096] 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 siguen el sistema de numeración de Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (es decir, SEC ID nº 1 a nº 216) no están 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 numeración de Kabat.

[0097] La referencia a 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, se pretende decir 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 presente 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 delecionarse o sustituirse por otro nucleótido, o puede insertarse en la secuencia de referencia un grupo de nucleótidos de hasta 5% de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia.

[0098] En la práctica, puede determinarse convencionalmente si alguna molécula particular de ácido nucleico o de polipéptido es idéntica por lo menos al 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% a una secuencia de nucleótidos o polipeptídica de la presente invención utilizando programas informáticos conocidos. Un método para determinar la correspondencia global óptima entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencia de base de datos, también denominado alineación global de secuencias, 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 dos secuencias, la problema y la de la base de datos, son secuencias de ADN. Puede

compararse una secuencia de ARN mediante la conversión de los U en T. El resultado de dicha alineación global de secuencias se expresa en porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en una alineación de FASTDB de las secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=unitaria, k-tuplo=4, penalización por no apareamiento=1, penalización por unión=30, longitud de grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, penalización por hueco=5, penalización por tamaño de hueco=0,05, tamaño de ventana=500 ó la longitud de la secuencia de aminoácidos de base de datos, la que sea más corta.

[0099] En el caso de que la secuencia de base de datos sea más corta que la secuencia problema 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 los truncados 5' y 3' de la secuencia de base de datos al calcular el porcentaje de identidad global. Para secuencias de base de datos truncadas en los extremos 5' ó 3' respecto a la secuencia problema, se corrige el porcentaje de identidad calculando el número de bases de la secuencia problema que se encuentran 5' y 3' respecto a la secuencia de base de datos, que no corresponden/no se encuentran alineados, como porcentaje del total de bases de la secuencia problema. Se determina si un nucleótido es correspondiente/se encuentra alineado a partir de los resultados de la alineación de secuencias de FASTDB. A continuación, se resta este porcentaje del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anteriormente indicado utilizando los parámetros especificados, para llegar a un valor final de porcentaje de identidad. Esta puntuación corregida es la utilizada para los fines de la presente invención. Únicamente las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia de base de datos, tal como se visualizan en la alineación de FASTDB, que no sean correspondientes/se encuentren alineadas con la secuencia problema, se calculan con el fin de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad.

[00100] Por ejemplo, una secuencia de base de datos de 90 bases se alinea con una secuencia problema de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo 5' de la secuencia de base de datos y por lo tanto, la alineación de FASTDB no muestra una correspondencia/alineación de las primeras bases en el extremo 5'. Los 10 residuos no apareados representan 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos 5' y 3' no

correspondientes/número total de bases en la secuencia problema), de manera que se resta 10% del valor de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. En el caso de que los restantes 90 residuos fueran perfectamente correspondientes, el porcentaje de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia de base de datos de 90 bases con una secuencia problema de 100 bases. En esta ocasión las deleciones son internas, de manera que no existen residuos en los extremos 5' ó 3' de la secuencia de base de datos que no sean correspondientes/no se encuentren alineados con la secuencia problema. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Nuevamente, únicamente las bases 5' y 3' de la secuencia de base de datos que no sean correspondientes/no se encuentren alineados con la secuencia problema se corrigen manualmente. No se realiza ninguna otra corrección manual para los fines de la presente invención.

[00101] Al indicar que un polipéptido presenta una secuencia de aminoácidos por lo menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos problema de la presente invención, se hace referencia a que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la base de datos es idéntica a la secuencia problema excepto en que la secuencia polipeptídica de la base de datos puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos problema. En otras palabras, para obtener un polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos problema, pueden insertarse, delecionarse o sustituirse por otro aminoácido hasta 5% de los residuos aminoácidos en la secuencia de la base de datos. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino-terminales o carboxi-terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre dichas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

[00102] En la práctica, si cualquier polipéptido particular es idéntico por lo menos al 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% respecto a un polipéptido de referencia puede determinarse convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos. Un método para determinar la correspondencia global óptima entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y

una secuencia de base de datos, también denominado alineación global de secuencias, 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 problema y de base de datos son ambas secuencias de nucleótidos o son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación global de secuencias se expresa como porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en una alineación de aminoácidos de FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuplo=2, penalización por no apareamiento=1, penalización por unión=20, longitud de grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, tamaño de ventana=longitud de la secuencia, penalización por hueco=5, penalización por tamaño de hueco=0,05, tamaño de ventana=500 ó la longitud de la secuencia de aminoácidos de base de datos, la que sea más corta.

[00103] En el caso de que la secuencia de base de datos sea más corta que la secuencia problema 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 los truncados N-terminales y C-terminales de la secuencia de base de datos al calcular el porcentaje de identidad global. Para secuencias de base de datos truncadas en los extremos N-terminal y C-terminal respecto a la secuencia problema, se corrige el porcentaje de identidad calculando el número de residuos de la secuencia problema que son N-terminales y C-terminales respecto a la secuencia de base de datos que no corresponden/no se encuentran alineados con un residuo correspondiente de la secuencia de base de datos, como porcentaje del total de bases de la secuencia problema. Se determina si un residuo es correspondiente/se encuentra alineado a partir de los resultados de la alineación de secuencias de FASTDB. A continuación, se resta este porcentaje del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anteriormente indicado utilizando los parámetros especificados, para llegar a un valor final de porcentaje de identidad. Este valor final de porcentaje de identidad es el utilizado para los fines de la presente invención. Únicamente se consideran los residuos en los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia de base de datos que no son correspondientes/no se encuentran alineados con la secuencia problema, para los fines de ajustar manualmente el valor de porcentaje de identidad. Es decir, únicamente posiciones de residuos de la secuencia

problema situados fuera de los residuos N-terminales y C-terminales más alejados de la secuencia de base de datos.

[00104] Por ejemplo, una secuencia de base de datos de 90 residuos aminoácidos se alinea con una secuencia problema de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo N-terminal de la secuencia de base de datos y por lo tanto, la alineación de FASTDB no muestra una correspondencia/aineación de los primeros 10 residuos desde el 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 correspondientes/número total de residuos en la secuencia problema), de manera que se resta 10% del valor de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. En el caso de que los restantes 90 residuos fueran perfectamente correspondientes, el porcentaje de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia de base de datos de 90 residuos con una secuencia problema de 100 residuos. En esta ocasión las deleciones son internas, de manera que no existen residuos en los extremos N-terminal o C-terminal de la secuencia de base de datos que no sean correspondientes/no se encuentren alineados con la secuencia problema. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Nuevamente, únicamente las posiciones de los residuos más allá de los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia de base de datos, tal como las muestra la alineación de FASTDB, que no son correspondientes/no se encuentran alineados con la secuencia problema son corregidas manualmente. No debe realizarse ninguna otra corrección manual para los fines de la presente invención.

[00105] El porcentaje de identidad de los polinucleótidos y/o polipéptidos también puede determinarse utilizando los programas BLAST disponibles del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con los parámetros por defecto indicados en los programas.

[00106] Tal como se utiliza en la presente memoria, un ácido nucleico que "*se hibride bajo condiciones restrictivas*" con 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 42ºC 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 65ºC.

[00107] Tal como se utiliza en la presente memoria, "*un 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 los oligosacáridos N-ligados. Lo anterior incluye los polipéptidos de fusión que muestran una actividad enzimática similar, aunque no necesariamente idéntica, a una actividad de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β-1,4-manosil-glucoproteína 4-β-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2.4.1.144), según el comité de nomenclatura del International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), medida en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de que exista dependencia de la dosis, ésta no es necesariamente idéntica a la de GnTIII, sino que, por el contrario, es sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con la GnTIII (es decir, el polipéptido candidato muestra una actividad mayor, o no superior a aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no superior a aproximadamente diez veces menos, y más preferentemente, no superior a aproximadamente tres veces menos actividad que GnTIII).

[00108] 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 del anclaje del polipéptido en una localización dentro del complejo de Golgi. Generalmente, los dominios de localización comprenden "colas" aminoterminales de un enzima.

[00109] 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 región Fc de secuencia variante de aminoácidos) de un anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, afinidad de unión a receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citoquinas, incorporación de antígenos por parte de células presentadoras de antígeno mediada por complejo inmunológico, regulación negativa de receptores de superficie celular, etc.

[00110] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*manipular, manipulado, manipulación*", particularmente con el prefijo "gluco", así como la expresión "manipulación mediante glucosilación", se considera que incluyen cualquier manipulación del patrón de glucosilación de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La glucomanipulación incluye la manipulación metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacáridos para conseguir la glucosilación alterada de las glucoproteínas expresadas en estas células. Además, la manipulación mediante glucosilación incluye los efectos de mutaciones y del ambiente celular sobre la glucosilación. En una realización, la manipulación mediante glucosilación es una alteración de la actividad de glucosiltransferasa. En una realización particular, la manipulación resulta en una actividad glucosaminiltransferasa y/o actividad fucosiltransferasa alterada.

[00111] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*célula huésped*" cubre 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, o molécula variante 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 dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal en cultivo.

[00112] 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 inmunológicas efectoras humanas".

[00113] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*células inmunológicas efectoras humanas*" se refiere a una población de leucocitos que expresan receptores de Fc sobre su superficie a través de los cuales se unen a la región Fc de moléculas de unión a antígeno o de proteínas de fusión con Fc y llevan a cabo funciones efectoras. Dicha población puede incluir, aunque sin limitarse a ellas, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células asesinas naturales (NK).

[00114] 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 de Fc (por ejemplo anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una región Fc) o proteínas de fusión con Fc. Las moléculas de unión a antígeno o proteínas de fusión de Fc se unen a las células diana a través de la parte proteína que es N-terminal respecto a la región Fc.

[00115] 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 molécula de unión a antígeno o de proteína de fusión con Fc, en el medio circundante a las células diana, por el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc definido anteriormente, y/o una reducción de la concentración de molécula de unión a antígeno o de la proteína 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 por el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc. El incremento de la citotoxicidad celular mediada por Fc es relativa 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 por el experto en la materia), pero que no ha sido producido por células huésped que han sido 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.

[00116] La expresión "*molécula de unión a antígeno que presenta una citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) incrementada*" se refiere a una molécula de unión a antígeno, tal como se define este término en la presente memoria, que presenta una ADCC incrementada según se determina mediante cualquier método adecuado conocido por el experto ordinario en la materia. Un ensayo *in vitro* de ADCC aceptado es el siguiente:

1) el ensayo utilizó células diana que es conocido que expresaban el antígeno diana reconocido por la región de unión a antígeno del anticuerpo,
2) el ensayo utiliza células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas, aisladas a partir de sangre de un donante sano seleccionado aleatoriamente, a modo de células efectoras,
3) el ensayo se lleva a cabo según el protocolo siguiente:

i) se aislan las PBMCs utilizando procedimientos estándares de centrifugación en gradiente de densidad y se suspenden a una densidad de $5x10^6$ células/ml en medio de cultivo celular RPMI,

ii) se cultivaron las células diana mediante métodos de cultivo de tejido estándares, se recolectan de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, se lavaron en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 µCuries de ^{51}Cr, se lavaron dos veces con medio de cultivo celular, y se resuspendieron en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml,

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

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

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene 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 anticuerpos (punto iv, anteriormente),

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

vii) la placa de microtitulación de 96 pocillos seguidamente se centrifuga a 50xg durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4ºC,

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMCs (punto i, anteriormente) a cada pocillo, rindiendo una proporción de célula efectora:diana de 25:1, y las placas se introducen en un incubador bajo una atmósfera de 5% de CO_2 a 37ºC durante 4 horas,

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

x) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo según la fórmula (ER-MR)/(MR-SR) x 100, en la que ER es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix, anteriormente) para la concentración de anticuerpos correspondiente, MR es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix, anteriormente) para los controles MR (ver el punto v, anteriormente), y SR es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix, anteriormente) para los controles SR (ver el 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 anticuerpos necesaria para alcanzar 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, polipéptidos y polinucleótidos de unión a antígeno anti-CEA

[00117] El antígeno CEA ha sido utilizado desde hace mucho tiempo como marcador de cáncer con fines diagnósticos. Se expresa a niveles anormales (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 de CEA no conjugados generalmente no son utilizados con fines terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CEA que se encuentran actualmente en ensayos piloto se administran en forma de conjugados radioactivos. 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). Un nivel incrementado de la expresión de CEA estimula un nivel incrementado de adhesión intercelular, lo 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 anti-CEA también podrían desempeñar un papel en la inhibición de la adhesión celular mediada por CEA y la metástasis de las células cancerosas.

[00118] En un aspecto, la invención se refiere a una molécula variante 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 una de las CDRs presenta una sustitución de por lo menos un residuo aminoácido en comparación con la CDR correspondiente de PR1A3, y en el que la molécula variante de unión a antígeno presenta una afinidad mejorada para CEA, preferentemente para CEA unido a membrana, en comparación con una molécula parental PR1A3 de unión a antígeno. La solicitud de patente internacional WO nº 2011/023787 describe moléculas de unión a antígeno anti-CEA con afinidad

mejorada para CEA en comparación con una molécula parental PR1A3 de unión a antígeno.

[00119] En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula variante de unión a antígeno 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 una sustitución de por lo menos un residuo aminoácido en comparación con la CDR correspondiente de PR1A3, y en el que la molécula variante de unión a antígeno presenta una estabilidad incrementada en comparación con una molécula parental PR1A3 de unión a antígeno. En una realización, la molécula parental PR1A3 de unión a antígeno es una molécula PR1A3 de unión a antígeno humanizada. En una realización, la molécula parental PR1A3 de unión a antígeno comprende la región variable de cadena pesada de CH7A (SEC ID nº 101). En una realización, la molécula parental PR1A3 de unión a antígeno comprende la región variable de cadena pesada CH7A (SEC ID nº 101) y la región variable de cadena ligera 2F1 (SEC ID nº 209). Dicha CDR o CDRs pueden ser CDRs truncadas y contienen, como mínimo, los residuos determinantes de especificidad (SDRs), según se define esta expresión en la presente memoria, para una CDR dada. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno comprende por lo menos una (por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDRs seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10, 12 a 56 y 217 a 224 (fig. 32 y fig. 36), comprendiendo los residuos de las CDRs que retienen la unión específica. En otra realización, la molécula variante de unión a antígeno comprende por lo menos una (por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDRs seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10, 12 a 56 y 217 a 224, o una variante o forma truncada de las mismas que contiene 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 variante de unión a antígeno comprende una CDR1 variante de cadena pesasda de PR1A3, la HCDR1 presenta un glutamato sustituido por una valina en la posición Kabat nº 31. En una realización específica, en la que la molécula variante de unión a antígeno comprende una CDR3 variante de cadena pesada de PR1A3, la HCDR3 presenta una alanina sustituida por una tirosina en la posición Kabat nº 98 o una tirosina sustituida por un aspartato en la posición Kabat nº 99. En una realización específica, en la que la

molécula variante de unión a antígeno comprende una CDR3 variante de cadena pesada de PR1A3, la HCDR3 presenta una alanina sustituida por una tirosina en la posición Kabat nº 98 y una tirosina sustituida por un aspartato en la posición Kabat nº 99.

[00120] En una realización, la molécula variante de unión a antígeno comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre SEC ID nº 217 a 224 (fig. 36) y dos CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10 y 12 a 24 y/o tres CDRs de cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de entre SEC ID nº 36 a 56, o una variante o forma truncada de los mismos que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad de cada una de las CDRs. En una realización más específica, la molécula variante de unión a antígeno comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre SEC ID nº 217 a 224 y dos CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10 y 12 a 24 y/o tres CDRs de cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de entre SEC ID nº 36-56 . En otra realización, la molécula variante de unión a antígeno comprende la región o regiones variables de una cadena ligera y/o pesada de anticuerpo, preferentemente una región variable tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En una realización más particular, la región variable de cadena pesada y/o ligera se selecciona de entre las regiones variables de cadena pesada y/o ligera seleccionadas de entre SEC ID nº 99 a 108, SEC ID nº 188 a 216, y SEC ID nº 225 a 248 (fig. 33 y fig. 37A-C) o una combinación de las mismas, en las que, la región variable de cadena pesada y ligera no es una combinación de SEC ID nº 99 y SEC ID nº 103 ó SEC ID nº 100 y SEC ID nº 104. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende los residuos marco de CH1A1A (SEC ID nº 261) o CH1A1B (SEC ID nº 262) (fig. 37C). En una realización, la molécula variante de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de entre SEC ID nº 225, SEC ID nº 226, SEC ID nº 231, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243 ó SEC ID nº 247.

[00121] En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, más concretamente, un anticuerpo humanizado. En otra realización, la molécula variante de unión a antígeno comprende una región Fc. En otra

realización, la molécula variante de unión a antígeno es de afinidad madurada. En otra realización, la molécula variante de unión a antígeno se manipula para que presente una estabilidad incrementada (de estabilidad madurada). En otra realización, la molécula variante de unión a antígeno presenta una actividad ADCC incrementada en comparación con PR1A3. En una realización, la ADCC incrementada de la molécula variante de unión a antígeno se debe a un incremento de la afinidad de la molécula variante de unión a antígeno del CEA unido a membrana, por ejemplo mediante maduración de la 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 como referencia en la presente memoria). En otra realización, la molécula variante 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 variantes de unión a antígeno y a su utilización en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de la proliferación celular, en la que se expresa CEA, particularmente en la que CEA se expresa a niveles anormales (por ejemplo se sobreexpresa o se expresa en un patrón diferente en la célula) en comparación con el tejido normal del mismo tipo celular. Entre dichos trastornos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), el cáncer gástrico, el cáncer pancreático y el cáncer de mama. Los niveles de expresión del CEA pueden determinarse mediante métodos conocidos de la técnica y los descritos en la presente memoria (por ejemplo mediante ensayo inmunohistoquímico, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, transferencia western, unión de ligandos, actividad de quinasa, etc.).

[00122] 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 murino, o variantes o formas truncadas de las mismas que contiene 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 seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10, 12 a 56 y 217 a 224, comprendiendo los residuos de las CDRs que retienen la unión específica. 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 seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10, 12 a 56 y 217 a 224, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad (SDRs) de cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización más específica, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre SEC ID nº 217 a 224 y dos CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10 y 12 a 24 y/o tres CDRs de cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de entre SEC ID nº 36-56. 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 las cadenas pesada y 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 ligera seleccionada de entre SEC ID nº 99 a 108, SEC ID nº 188 a 216 y SEC ID nº 225-248 se selecciona de entre el grupo de los polinucleótidos de SEC ID nº 159 a 187 y SEC ID nº 249 a 256 ó una combinación de los mismos, en los que las regiones variables de las cadenas pesada y ligera no se encuentran codificadas por una combinación de SEC ID nº 11 y SEC ID nº 115 ó SEC ID nº 112 y SEC ID nº 116. En una realización, los polipéptidos de región variable de las cadenas pesada y ligera codificados por los polinucleótidos se combinan formando un anticuerpo quimérico, más concretamente 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 nº 31. En una realización específica, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una CDR3 de cadena pesada de PR1A3 ó una variante de la

misma, dicho polinucleótido codifica una alanina sustituida por una tirosina en la posición Kabat nº 98 ó una tirosina sustituida por un aspartato en la posición Kabat nº 99. En una realización específica, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica CDR3 de cadena pesada de PR1A3 o una variante de la misma, dicho polinucleótido codifica una alanina sustituida por una tirosina en la posición Kabat nº 98 y una tirosina sustituida por un aspartato en la posición Kabat nº 99. En una realización, el polinucleótido codifica una alanina sustituida por una tirosina en la posición Kabat nº 98 ó una tirosina sustituida por un aspartato en la posición Kabat nº 99 en el marco de CH1A1A (SEC ID nº 261) o CH1A1B (SEC ID nº 262). En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la cadena pesada de SEC ID nº 225, SEC ID nº 226, SEC ID nº 231, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243 ó la secuencia SEC ID nº 247. 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.

[00123] En un aspecto, la presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno o moléculas variantes de unión a antígeno (por ejemplo un anticuerpo o fragmento del mismo) y a polipéptidos que presentan la misma especificidad de unión del anticuerpo PR1A3 murino (por ejemplo la unión al mismo epítopo del CEA unido a membrana) y que presentan actividades biológicas comparables o mejoradas (por ejemplo una afinidad mejorada para CEA unido a membrana, una estabilidad incrementada y/o una ADCC incrementada). En una realización, la molécula variante de unión a antígeno se une al mismo epítopo que la molécula parental de unión a antígeno. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno compite para la unión a CEA humano unido a membrana con la molécula parental de unión a antígeno. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno se une a CEA humano unido a membrana y no se une a CEA humano soluble. En un aspecto, la presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno y a una molécula variante de unión a antígeno y polipéptidos que presentan una estabilidad incrementada en comparación con el anticuerpo PR1A3 murino o una variante humanizada del mismo. En un aspecto, la presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno y moléculas variantes de unión a antígeno (por ejemplo un anticuerpo o fragmento del mismo) y polipéptidos que se

unen a CEA unido a membrana y que presentan una estabilidad incrementada en comparación con un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende la región variable de cadena pesada de CH7A (SEC ID nº 101). En un aspecto, la presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno y moléculas variantes de unión a antígeno (por ejemplo un anticuerpo o fragmento del mismo) y polipéptidos que se unen a CEA unido a membrana y que presentan una estabilidad incrementada en comparación con un anticuerpo PR1A3 humanizado que comprende la región variable de cadena pesada CH7A (SEC ID nº 101) y la región variable de cadena ligera 2F1 (SEC ID nº 209).

[00124] En una realización, la molécula variante de unión a antígeno o polipéptido comprende por lo menos una (por ejemplo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las CDRs seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10, 12 a 56 y 217 a 224 (figs. 32 y 36). En una realización, la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno 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 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 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224. En otra realización, la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno 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 CDR2 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 SEC ID Nº 56. En algunas realizaciones, la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno que comprende las CDRs también comprende los residuos de marco de CH1A1A (SEC ID nº 261) o CH1A1B (SEC ID nº 262).

[0100] En un aspecto, la invención se refiere a una molécula o polipéptido variante de unión a antígeno que se une a 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 y/o ligera se selecciona de entre las regiones variables de cadena pesada y/o ligera seleccionadas de entre SEC ID nº 99-108, SEQ ID NOs: 188-216, and SEQ ID NOs: 225-248 (Fig. 33 and Fig.37A-C). En una realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta la secuencia de cualquiera de entre SEC ID nº 225 a 248. En una realización, el inmunoconjugado comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia de cualquiera de las secuencias SEC ID nº 225 a 248.

[0101] En una realización, la región variable de cadena pesada comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243 y SEC ID nº 247. 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 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243, y SEC ID nº 247. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 209. 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 209.

[0102] En una realización, la molécula de unión a antígeno, molécula variante de unión a antígeno o polipéptido que se une a CEA humano unido a membrana, comprende una región variable de cadena pesasda 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, a continuación:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEX^{1}X^{2}MX^{3}WVRQAPGQGLEW
MGX^{4}INTKX^{5}GEAX^{6}YX^{7}EEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTA
VYYCARWDX^{8}X^{9}X^{10}YX^{11}X^{12}X^{13}X^{14}DYWGQGTTVTVSS

en la que X^1 es Y o F; X^2 es S o G; X^3 es N o S; X^4 es W o Y; X^5 es N, T o S; X^6 es T o N; X^7 es V o I; X^8 es F o A; X^9 es Y, A, V, F o S; X^{10} es D, H, W, E, o Y; X^{11} es V, L o F; X^{12} es E, K o Q; X^{13} es A o T; y X^{14} es M o L.

[0103] En una realización específica, la región variable de cadena ligera comprende un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 11, a continuación:

[0104] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASX15X16X17X18X19X20VAWYQ QKPGKAPKX21LIYX22ASX23X24X25X26GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK

[0105] en la que X^{15} es Q, A, K o H; X^{16} es N, A, Y, I, K, T o F; X^{17} es V, A, G o M; X^{18} es G, S, T, o L; X^{19} es T, N, P o A; X^{20} es N o Y; X^{21} es P o L; X^{22} es S, L o W; X^{23} es Y, N o H; X^{24} es R, L, P o H; X^{25} es Y, S, Q, K, E, F o P; y X^{26} es S, G, I o R.

[0106] En otro aspecto, la invención se refiere además a polinucleótidos aislados codificantes de las moléculas de unión a antígeno, a moléculas variantes de unión a antígeno o polipéptidos que se unen a CEA unido a membrana. 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 seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10, 12 a 56 y 217 a 224, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad (SDRs) de cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización más específica, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre SEC ID nº 217 a 224 y dos CDRs de cadena pesada (por ejemplo HCDR1 y HCDR2) seleccionadas de entre SEC ID nº 1 a 3, 5 a 10 y 12 a 24 y/o tres CDRs de cadena ligera (por ejemplo LCDR1, LCDR2 y LCDR3) seleccionadas de entre SEC ID nº 36-56. 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 las cadenas pesada y 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 ligera seleccionada de entre SEC ID nº 99 a 108, SEC ID nº 188 a 216, y SEC ID nº 225 a 248 se selecciona de entre el grupo

de polinucleótidos seleccionados de entre SEC ID nº 159 a 187 y SEC ID nº 249 a 256 ó una combinación de los mismos, en los que las regiones variables de las cadenas pesada y ligera no se encuentran codificadas por una combinación de SEC ID nº 11 y SEC ID nº 115 ó SEC ID nº 112 y SEC ID nº 116. En una realización, los polipéptidos de región variable de las cadenas pesada y ligera codificados por los polinucleótidos se combinan formando un anticuerpo quimérico, más concretamente un anticuerpo humanizado.

[0125] En una realización, la molécula de unión a antígeno, la molécula variante de unión a antígeno o el polipéptido que se une a CEA unido a membrana comprende una región Fc. En una realización más específica, la molécula de unión a antígeno, la molécula variante de unión a antígeno, o el polipéptido se glucomanipulan para que presenten un patrón alterado de glucosilación en la región Fc. En una realización particular, la afinidad para el CEA unido a membrana de la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno se encuentra incrementada en comparación con la del anticuerpo PR1A3 parental. En otra realización, la estabilidad de la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno se encuentra incrementada en comparación con la del anticuerpo PR1A3 parental. En otra realización, la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno presenta una actividad de ADCC incrementada. En una realización, la ADCC incrementada de la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno 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.

[0126] En otro aspecto, la invención también se refiere a la utilización de la molécula de unión a antígeno y de la molécula o polipéptido variante de unión a antígeno en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de la proliferación celular, en la que se expresa CEA, particularmente en la que CEA se expresa a niveles anormales (por ejemplo se sobreexpresa o se expresa en un patrón diferente en la célula) en comparación con el tejido normal del mismo tipo celular. Entre dichos trastornos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), el cáncer gástrico, el cáncer pancreático y el cáncer de mama. Los niveles de expresión del CEA pueden determinarse mediante métodos conocidos de la técnica y los descritos en la presente memoria (por ejemplo mediante ensayo inmunohistoquímico, ensayo de

inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, transferencia western, unión de ligandos, actividad de quinasa, etc.).

[0127] En una realización particular, la invención se refiere a una molécula humanizada de unión a antígeno o a una parte o fragmento de la misma que se une a CEA unido a membrana, comprendiendo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de cualquiera de entre SEC ID nº 225 a 248. En otra realización, la invención se refiere a una molécula humanizada de unión a antígeno o a una parte o fragmento de la misma que se une a CEA unido a membrana, comprendiendo una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de cualquiera de entre SEC ID nº 105, 108 ó 207 a 216. En una realización particular, la molécula humanizada de unión a antígeno o a una parte o fragmento de la misma que se une a CEA unido a membrana comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de cualquiera de entre SEC ID nº 225 a 248 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de cualquiera de entre SEC ID nº 105, 108 ó 207 a 216. En una realización, la molécula humanizada de unión a antígeno 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 humanizada de unión a antígeno comprende una región Fc, más particularmente, una región Fc que ha sido glucomanipulada.

[00128] 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; de la patente US nº 6.180.370, de Queen *et al.*, o de la patente US nº 6.632.927, de Adair *et al.*, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria. Preferentemente, en un anticuerpo humanizado se han introducido uno o más residuos aminoácidos procedentes de una fuente no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "importados", los cuales típicamente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización esencialmente puede llevarse a cabo siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986;

Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536, 1988), mediante la sustitución de secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Típicamente, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en un anticuerpo no humano (por ejemplo de roedor). Los anticuerpos anti-CEA humanizados de la invención opcionalmente comprenden regiones constantes procedentes de una inmunoglobulina humana.

[00129] La elección de dominios variables de cadena ligera y pesada para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con 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 región variable humanas conocidas. La secuencia humana más similar a la del donante (por ejemplo de roedor) seguidamente se acepta como la región marco humana (FR) 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 individiual del marco donante (por ejemplo de roedor) completo (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 humanas que corresponden a dicha subregión de marco (por ejemplo según se determine a partir de la numeración Kabat) y seleccionar la secuencia humana para cada subregión o combinación que sea más similar a la de roedor (solicitud publicada de patente US nº 2003/0040606A1, de Leung, publicada el 27 de febrero de 2003). Otro método utiliza una región de marco particular 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 región FR1-3 seleccionada para el aceptor para las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de las ABMs anti-CEA humanizadas pueden encontrarse codificadas en diferentes genes de línea germinal) o como parte del mismo gen de línea germinal. En una realización más específica, la FR1-3 de cadena pesada se encuentra codificada por la secuencia de gen de línea germinal de inmunoglobulina humana IGHV7_4_1*02 (nº de acceso X62110, SEC ID nº 114). En otra realización específica, la FR1-3 de cadena ligera se encuentra codificada por la secuencia de gen de línea germinal de inmunoglobulina humana IMGT_hVK_1_39 (nº de acceso X59315, SEC ID nº 118). En otra realización específica, la FR4 de cadena pesada se encuentra codificada por la secuencia del gen de línea germinal JH6 (ver nº de acceso de GenBank M63030). En otra realización específica, la FR4 de cadena ligera se encuentra codificada por la secuencia del gen de línea germinal JK2 (ver nº de acceso de GenBank X61584).

[00130] Resulta generalmente deseable que las moléculas de unión a antígeno, tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos, se humanicen conservando la alta afinidad 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 parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina 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 de inmunoglobulina seleccionadas. El análisis de dichas expresiones ayuda a determinar 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 del receptor y secuencias importadas 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.

[00131] En un aspecto, la invención se refiere a moléculas de unión a antígeno anti-CEA humanizadas de afinidad madurada y/o variantes con propiedades y características deseables que incluyan, aunque sin limitarse a ellas: una fuerte afinidad de unión para el antígeno CEA (en particular CEA unido a membrana), no presentando reactividad cruzada sustancial contra CEA soluble; una capacidad para inducir 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 *in vitro* mediada por CEA; una capacidad de inhibir el crecimiento de tejido tumoral y/o de inducir la regresión de tejido tumoral (por ejemplo tal como se demuestra en modelos tumorales (por ejemplo de xenoinjerto de ratón)).

[00132] Tal como se describe en la presente memoria, en algunas realizaciones, las moléculas variantes de unión a antígeno de la invenicón 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 y de las moléculas variantes 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 humanizadas o variantes de unión a antígeno de la invención se unen a CEA humano, preferentemente a CEA unido a membrana, con una constante de afinidad monovalente (K_D) no superior a un valor de entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 0,001 nM, más concretamente no superior a entre aproximadamente 800 nM y aproximadamente 1 nM, y todavía más concretamente no superior a un valor de entre aproximadamente 550 nM y aproximadamente 10 nM. En una realización específica, la molécula variante de unión a antígeno es un anticuerpo de afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de la constante de afinidad monovalente (K_D) no superior a un valor de entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 10 nM. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es un anticuerpo de afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de la constante de afinidad monovalente (K_D) no superior a un valor de entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente

0,01 nM. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es un anticuerpo de afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de la constante de afinidad monovalente (K_D) no superior a un valor de entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 0,1 nM. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno es un anticuerpo de afinidad madurada o fragmento del mismo que se une a CEA unido a membrana con un valor de la constante de afinidad monovalente (K_D) de 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM o inferior. En algunas realizaciones, la molécula variante de unión a antígeno es un anticuerpo de estabilidad madurada (manipulado para que presente una estabilidad incrementada) o fragmento del mismo que conserva la afinidad de unión incrementada de su molécula parental de afinidad madurada. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno se une al CEA unido a membrana con una afinidad más alta que su unión a CEA liberado. En una realización, la molécula variante de unión a antígeno se une al CEA unido a membrana con una afinidad 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20 ó más veces superior a la que se une a CEA liberado.

[00133] En una realización, la molécula variante de unión a antígeno de la invención típicamente se une al mismo epítopo que el 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 epítopo sobre CEA humano unido a 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 rutinario, tal como el descrito en ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, editores Harlow y Lane, 1988. Alternativamente, puede llevarse a cabo el mapeado de epítopos, 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 epítopo de interés.

[00134] En una realización, las moléculas variantes de unión a antígeno específicas para el CEA humano se preparan a partir de una molécula parental de unión a antígeno anti-CEA que comprende por lo menos una CDR del anticuerpo monoclonal PR1A3, en las que el anticuerpo parental anti-CEA se une al mismo epítopo que el anticuerpo PR1A3 y es capaz de competir con PR1A3 para la unión a 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 PR1A3; 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 variante de unión a antígeno comprenda la HCDR1 de PR1A3, dicha HCDR1 comprende una sustitución de glutamato por valina en la posición Kabat nº 31. Las ABMs variantes típicamente presentan una mayor afinidad para CEA que la molécula parental. En una realización, las ABMs variantes presentan una estabilidad incrementada en comparación con la parental. En una realización, las ABMs variantes presentan una estabilidad incrementada en comparación con 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 de ADCC incrementada en comparación con el ABM parental. En una realización particular, la ADCC incrementada es el resultado de la afinidad incrementada que se alcanza, por ejemplo, mediante maduración de la afinidad del ABM parental, generando el ABM variante. En una realización más particular, el incremento de 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, el ABM variante incrementa la ADCC entre por lo menos aproximadamente 10% y aproximadamente 100% en un ensayo de citotoxicidad in vitro. En una realización más particular, el ABM variante es entre por lo menos aproximadamente 10 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 de ADCC incrementada es el resultado de la glucomanipulación de la región Fc. En otra realización particular, la actividad de ADCC incrementada es el resultado de la combinación de afinidad incrementada y glucomanipulación.

[00135] En una realización, las moléculas variantes de unión a antígeno de la invención comprenden una o más sustituciones de aminoácido en por lo menos una CDR. El número de sustituciones de aminoácido 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 aminoácido. En otra realización, por lo menos una CDR de cadena ligera comprende una o más sustituciones de aminoácido. 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 variante de unión a antígeno comprenda HCDR1 de PR1A3, dicha HCDR1 comprende una sustitución de glutamato por valina en la posición Kabat nº 31.

[00136] 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 una conformación de hoja o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las moléculas variantes de unión a antígeno 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, mutagénesis sitio-dirigida y/o maduración de la afinidad de la molécula parental de unión a antígeno, por ejemplo mediante expresión fágica.

[00137] Con el fin de identificar los sitios candidatos, por ejemplo residuos de región hipervariable, para la modificación, puede llevarse a cabo mutagénesis por escaneo de alaninas con el fin de encontrar residuos que contribuyan significativamente a la unión de antígenos. Alternativamente, o adicionalmente, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contracto entre el anticuerpo y CEA humano. Dichos residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para la sustitución según métodos conocidos de la técnica y/o indicados en la presente memoria. Tras generarse dichas variantes, el panel de variantes puede cribarse mediante métodos conocidos de la técnica y/o descritos en la presente memoria y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes, para el desarrollo posterior.

[00138] Puede utilizarse la expresión fágica para generar un repertorio de secuencias de región hipervariable 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 ó 7 sitios) con el fin de generar todas las sustituciones de aminoácido posibles 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 de nucleótido 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 en forma de fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. A continuación, las variantes expresadas fágicamente se criban para sus actividades biológicas (por ejemplo la afinidad de unión), tal como se da a conocer en la presente memoria, y los candidatos que presenten 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. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-4366, 1991, el contenido completo de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria. 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 como referencia en la presente memoria.

[00139] En algunas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno y las moléculas variantes 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 indica en SEC ID nº 121 y nº 122.

[00140] Sin embargo, también se encuentran comprendidas en la presente invención variantes e isoformas de la región Fc humana. Por ejemplo, pueden producirse regiones Fc variantes adecuadas para la utilización en la presente invención según los métodos que se enseñan en la patente US nº 6.737.056, de Presta (regiones Fc

variantes con función efectora alterada debida a una o más modificaciones de aminoácidos), o en la solicitudes de patente US nº 60/439.498, nº 60/456.041, nº 60/514.549 ó patente WO nº 2004/063351 (regiones variantes Fc con afinidad de unión incrementada debida a la modificación de aminoácidos) o en la solicitud de patente US nº 10/672.280 ó en la patente WO nº 2004/099249 (variantes de Fc con unión alterada a FcγR debido a modificaciones de aminoácidos), el contenido de cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria. En una realización particular, las ABMs anti-CEA y las ABMs variantes comprenden una región Fc que ha sido glucomanipulada para alterar la actividad de función efectora de la ABM (por ejemplo de reducción de la fucosilación, de mejora de la afinidad de unión a receptor de Fc, de incremento de la ADCC, etc.). Los métodos de glucomanipulación que pueden utilizarse se describen en detalle posteriormente en la presente memoria y son conocidos de la técnica.

[00141] En una realización, la molécula de unión a antígeno o molécula variante de unión a antígeno de la presente invención se conjuga con un grupo adicional, tal como un marcaje radioactivo o una toxina. Dichas moléculas conjugadas de unión a antígeno 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".

Vectores de expresión y células huésped

[0107] En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión y/o a una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente invención. Por ejemplo, la célula huésped o el vector de expresión comprende uno o más cualesquiera de los polinucleótidos o polinucleótidos codificantes de los polipéptidos, ABMs y/o ABMs variantes indicadas en la presente memoria. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una ABM que se une 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 a CEA unido a membrana.

[0108] 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 ó células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales como línea celular de fondo para generar las células huésped manipuladas de la invención.

[0109] En una realización específica, la célula huésped o el vector de expresión comprende uno o más polinucleótidos codificantes de una ABM anti-CEA tal como se proporciona en la presente memoria. En una realización, se ha madurado la afinidad del anticuerpo. 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, el anticuerpo presenta propiedades terapéuticas deseables, incluyendo, aunque sin limitación: fuerte afinidad de unión para el antígeno CEA, en particular CEA unido a membrana, no no presentando reactividad cruzada sustancial contra CEA soluble; capacidad para inducir lisis celular de células que expresan CEA *in vitro* y *ex vivo*, preferentemente de una manera dependiente de la dosis; capacidad de inhibir la adhesión celular *in vitro* mediada por CEA; capacidad para inhibir el crecimiento de tejido tumoral y/o para inducir la regresión de tejido tumoral en modelos tumorales en ratones (por ejemplo de xenoinjerto en el ratón). En otra realización, el anticuerpo presenta una estabilidad incrementada en comparación con el anticuerpo parental a partir del que se derivó el anticuerpo más estable. En otra realización, el anticuerpo variante o fragmento del mismo comprende una Fc humana.

[0110] En una realización, puede expresarse uno o varios polinucleótidos codificantes de un ABM de la presente invención bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulada. Entre los sistemas de expresión regulada adecuados se incluyen, aunque sin limitación, 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 térmicamente y un sistema de expresión inducible por metal de metalotioneína. En el caso de que se encuentren comprendidos varios ácidos nucleicos diferentes codificantes de un ABM de la presente invención dentro del sistema de célula 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 el nivel más alto posible de expresión estable de polipéptido que no presenta un 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 el ABM o un anticuerpo específico para una etiqueta péptido fusionada con el ABM, y el análisis de transferencia northern. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede ligarse operablemente a un gen informador; los niveles de expresión de un ABM dado 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 dicho ABM en forma de una sola molécula de ARNm; las secuencias codificantes respectivas pueden unirse 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 un ABM dado a conocer en la presente memoria, de manera que se forma una única cadena polipeptídica. Los ácidos nucleicos codificantes de un ABM de la presente invención pueden ligarse operablemente con el gen informador bajo el control de un único promotor, de manera que el ácido nucleico codificante del ABM y el gen informador se transcriben en una molécula de ARN que se procesa alternativamente en dos moléculas separadas de ARN mensajero (ARNm); uno de los ARNm resultantes se traduce en dicha proteína informadora y la otra se traduce en el ABM.

[0111] Pueden utilizarse métodos que son bien conocidos por el experto en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante

de un ABM anti-CEA proporcionado en la presente memoria conjuntamente con señales apropiadas de control transcripcional/traduccional. Entre dichos métodos se incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, 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 en Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989.

[0112] Puede utilizarse una diversidad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar la secuencia codificante de los ABMs de la presente invención. Preferentemente se utilizan células de mamífero como sistemas de células huésped transfectados con vectores de expresión de ADN plasmídico recombinante o de 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 ó células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales como sistema de célula huésped. Se describen algunos ejemplos de sistema de expresión y métodos de selección 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 y Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123, 2002, en Chadd y Chamow, Curr. Op. Biotechnol. 12:188-194, 2001, y en Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12: 450-454, 2001.

[0113] En realizaciones alternativas, pueden utilizarse otros sistemas de células huésped eucariótica, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de un ABM de la presente invención, tales como los sistemas de expresión enseñados en la solicitud de patente US nº 60/344.169 y en las patentes WO nº 60/344.169 y nº 03/056914 (métodos para producir glucoproteínas de tipo humano en una célula huésped eucarióticas no humanas) (el contenido de cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad); sistemas de células de insecto infectadas por vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo

baculovirus) que contienen la secuencia codificante de un anti-CEA; sistemas de células vegetales infectados por vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo el plásmido Ti) que contienen la secuencia codificante del 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 procedentes de lenteja de agua genéticamente manipulada); las patentes WO nº 2004/057002 (producción de proteínas glucosiladas en células de briófito mediante la introducción de un gen de glucosiltransferasa) y nº 2004/024927 (métodos de generación de proteína no vegetal heteróloga extracelular en protoplasto de musgo), y solicitudes de patente US nº 60/365.769 y nº 60/368.047 y patente WO nº 2003/078614 (procesamiento de glucoproteínas en plantas transgénicas que comprenden un enzima GnTIII de mamífero funcional) (el contenido de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria), o sistemas de células animales infectados por vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo de adenovirus, virus Vaccinia), incluyendo líneas celulares manipuladas para que contengan múltiples copias del ADN codificante de un ABM anti-CEA quimérico amplificado establemente (CHO/dhfr) o amplificado inestablemente en cromosomas dobles diminutos (por ejemplo líneas celulares murinas). En una realización, el vector que comprende el polinucleótido o polinucleótidos codificantes del ABM de la invención es policistrónico. Además, en una realización, el ABM comentado anteriormente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización, el ABM es un anticuerpo de afinidad madurada. En una realización, el ABM es un anticuerpo de estabilidad madurada.

[0114] La expresión estable resulta generalmente preferente a la expresión transitoria debido a que típicamente consigue resultados más reproducibles y que también permiten más fácilmente la producción a gran escala; sin embargo, se encuentra comprendido dentro de los conocimientos del experto en la materia la determinación de si la expresión transitoria resulta mejor para una situación particular. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, las células huésped pueden transformarse con los ácidos nucleicos codificantes respectivos controlados por los elementos apropiados de control de la

expresión (por ejemplo secuencias de promotor o intensificador, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción de ADN foráneo, las células manipuladas pueden crecer durante 1 ó 2 días en un medio enriquecido y después pasarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante proporciona resistencia a la selección y permite la selección de células que han integrado establemente el plásmido en sus cromosomas y crecen formando focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse formando líneas celulares.

[0115] Pueden utilizarse varios sistemas de selección, entre ellos, aunque sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler *et al.*, Cell 11:223, 1977), de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026, 1962) y de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22:817, 1980), los cuales pueden utilizarse en células tk^-, $hgprt^-$ o $aprt^-$, respectivamente. Además, puede utilizarse la resistencia a metabolitos como base de la selección para los genes 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 hygro, que proporciona resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30:147, 1984). Recientemente se han descrito otros genes seleccionables: trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047, 1988); el sistema de la glutamina sintasa, y la ODC (ornitina descarboxilasa), que proporciona resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: Current Communications in Molecular Biology, editado por Cold Spring Harbor Laboratory, 1987).

[0116] La presente invención se refiere además a un método para modificar el perfil de glucosilación de los ABMs de la presente invención que son producidos por una célula huésped, comprendiendo expresar en dicha célula huésped un 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 glucosiltransferasa se incluyen la β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), la α-manosidasa II (ManII), la β(1,4)-galactosiltransferasa (GalT), la β(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y la β(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII). En una realización, se expresa en la célula huésped una combinación de genes con actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII y ManII). De manera similar, un método también comprende la expresión de uno o más polinucleótidos codificantes del ABM en una célula huésped en la que un gen glucosiltransferasa ha sido interrumpido o de otro modo desactivado (por ejemplo una célula huésped en la que la actividad del gen codificante de la α1,6-fucosiltransferasa nuclear ha sido desactivado). En otra realización, los 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 Golgi. En otra realización preferente, la expresión de los 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 incrementada a receptor de Fc y/o una función efectora incrementada. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, 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 un ABM de la presente invención, tal como un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado que se une al 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 patente US nº 2004/0241817, el contenido completo de las cuales se incorpora expresamente como referencia en la presente memoria. En una realización particular, el ABM modificado producido 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, el ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende una región Fc.

[0117] Los ABMs con glucosilación alterada producidos por las células huésped de la invención típicamente muestran una afinidad de unión incrementada al receptor de Fc y/o una función efectora incrementada como resultado de la modificación de la célula huésped (por ejemplo mediante expresión de un gen de glucosiltransferasa). Preferentemente, la afinidad de unión incrementada a receptor de Fc es la unión incrementada a un receptor de Fcγ activador, más preferentemente el receptor 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, secreción de citoquinas incrementada, incorporación incrementada de antígenos por parte de células presentadoras de antígeno mediada por complejo inmunológico, citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada, unión a células NK incrementada, unión a macrófagos incrementada, unión a células polimorfonucleares (PMNCs) incrementada, unión a monocitos incrementada, entrecruzamiento de anticuerpos unidos a diana incrementado, señalización directa inductora de apoptosis incrementada, maduración de células dendríticas incrementada o cebado de células T incrementado.

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

[0118] En un aspecto, la presente invención proporciona glucoformas de ABMs anti-CEA (por ejemplo ABMs variantes) que presentan una función efectora incrementada, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La manipulación mediante 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 genes implicados en la glucosilación también se describen en la presente memoria en detalle (ver, por ejemplo, la sección titulada "Vectores de expresión y células

huésped", anteriormente). También se consigue un incremento de la ADCC de las ABMs de la presente invención mediante el incremento de 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 de mejora de la afinidad (ver Tang *et al.*, J. Immunol. 179:2815-2823, 2007). Las combinaciones de diferentes enfoques también se encuentra comprendidas dentro de la presente invención.

[0119] Algunos ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales (mAbs) no conjugados destinados al tratamiento de algunos tipos de cáncer recientemente han proporcionado resultados alentadores (Dillman, Cancer Biother. *& Radiopharm.* 12:223-25, 1997; Deo *et al.*, Immunology Today 18:127, 1997. Se ha aprobado una IgG1 quimérica no conjugada para el linfoma no Hodgkin de células B folicular o de grado bajo (Dillman, Cancer Biother. *& Radiopharm.* 12:223-25, 1997), mientras que otro mAb no conjugado, una IgG1 humanizada con diana en tumores mamarios sólidos, también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III (Deo *et al.*, Immunology Today 18:127, 1997). Los antígenos de estos dos mAbs se expresan a nivel elevado en sus células tumorales respectivas y los anticuerpos median en una potente destrucción tumoral por parte de células efectoras *in vitro* e *in vivo*. En contraste, muchos otros mAbs no conjugados con especificidades tumorales finas no pueden inducir funciones efectoras de potencia suficiente para resultar clínicamente útiles (Frost *et al.*, Cancer 80:317-33, 1997; Surfus *et al.*, J. Immunother. 19:184-91, 1996). Para algunos de estos mAbs más débiles, en la actualidad se está investigando la terapia complementaria de 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 a las células diana, resulta inducida por la unión de receptores de los leucocitos a la región constante (Fc) de los anticuerpos (Deo *et al.*, Immunology Today 18:127, 1997).

[0120] Un enfoque diferente, aunque complementario, al incremento de la actividad de ADCC de las IgG1s no conjugadas es manipular la región Fc del anticuerpo. Algunos 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 a la Asn297 conservada en la región CH2 (Lund *et al.*, J. Immunol. 157:4963-69, 1996; Wright y Morrison, Trends Biotech. 15:26-31, 1997), sugiriendo que tanto el oligosacárido como el polipéptido contribuyen directamente al sitio de interacción o que el oligosacárido resulta necesario para mantener una conformación polipeptídica de CH2 activo. Por lo tanto, podría explorarse la modificación de la estructura de los oligosacáridos como medio para incrementar la afinidad de la interacción.

[0121] Una molécula de IgG porta dos oligosacáridos N-ligados en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Al igual que cualquier glucoproteína, un anticuerpo es producido en forma de población de glucoformas que comparten el mismo esqueleto polipeptídico pero que presentan diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glucosilación. Los oligosacáridos normalmente presentes en la región Fc de la IgG sérica son de tipo biantenario complejo (Wormald *et al.*, Biochemistry 36:130-38, 1997), con un nivel bajo de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina bisectada (GlcNAc), y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación nuclear. Algunos estudios sugieren que la estructura de carbohidrato mínima necesaria para la unión de FcγR se encuentra dentro del núcleo oligosacárido (Lund *et al.*, J. Immunol. 157:4963-69, 1996).

[0122] Las líneas celulares derivadas de ratón o de hámster utilizadas en la industria y en las universidades para la producción de mAbs terapéuticos no conjugados normalmente unen los determinantes oligosacáridos necesarios a los sitios Fc. Las IgGs expresadas en dichas líneas celulares, sin embargo, no presentan el GlcNAc biantenario presente en cantidades reducidas en las IgGs séricas. Lifely *et al.*, Glycobiology 318:813-22, 1995. En contraste, recientemente se ha observado que una IgG1 humanizada producida por mieloma de ratón (CAMPATH-1H) portaba un GlcNAc bisectado en alguna de sus glucoformas (Lifely *et al.*, Glycobiology 318:813-22, 1995). El anticuerpo derivado de células de rata alcanzó una actividad de ADCC *in vitro* máxima de nivel similar al de los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares estándares, aunque a concentraciones de anticuerpo significativamente inferiores.

[0123] El antígeno CAMPATH normalmente se encuentra presente a niveles elevados sobre células de linfoma, y este mAb quimérico presenta una actividad ADCC elevada en ausencia de un GlcNAc bisectado (Lifely *et al.*, Glycobiology

318:813-22, 1995). En la ruta de glucosilación N-ligada, GnTIII añade un GlcNAc biantenario (Schachter, Biochem. Cell Biol. 64:163-81, 1986).

[0124] Estudios anteriores utilizaron una única línea celular CHO productora de anticuerpos que había sido previamente manipulada para expresar, de un modo externamente regulado, diferentes niveles de un gen clonado del enzima GnTIII (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 GenTIII) 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 una a CEA unido a membrana, que comprende una región Fc o una región equivalente a una región Fc, que presenta una glucosilación alterada que resulta de la modificación del nivel de expresión de un gen de glucosiltransferasa en la célula huésped productora de ABM. En una realización específica, la modificación del nivel de expresión génica es un incremento de la actividad de GnTIII. La actividad incrementada de GnTIII resulta en un incremento del porcentaje de oligosacáridos bisectados, así como en una reducción del porcentaje de residuos de fucosa, en la región Fc del ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, presenta una afinidad incrementada de unión al receptor de Fc y una función efectora incrementada.

[0125] La presente invención también se refiere a un método para producir un ABM anti-CEA 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 un ABM según la presente invención, en el que dicho polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa se exprsa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicho ABM producido por dicha célula huésped, y (b) aislar dicho 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 GnTI. Alternativamente, el dominio de localización en el 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 α1,6-fucosiltransferasa nuclear. Los ABMs producidos mediante los métodos de la presente invención presentan una afinidad de unión a receptor de Fc incrementada y/o una función efectora incrementada. Generalmente, la función efectora incrementada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada (incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) incrementada, la secreción de citoquinas incrementada, la incorporación incrementada de antígeno por parte de células presentadoras de antígeno mediada por complejo inmunológico, la unión a células NK incrementada, la unión a macrófagos incrementada, la unión a monocitos incrementada, la unión a células polimorfonucleares incrementada, la señalización directa inductora de apoptosis incrementada, el entrecruzamiento de anticuerpos unidos a diana incrementado, la maduración de células dendríticas incrementada o el cebado de células T incrementado. La unión a receptor de Fc incrementada preferentemente es la unión incrementada a un receptor de Fc activador, tal como FcγRIIIa. En una realización particularmente preferente, el ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

[0126] En una realización, el porcentaje de oligosacáridos N-ligados bisectados en la región Fc de los ABM es de entre por lo menos aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, específicamente de por lo menos aproximadamente 50%, más específicamente, de por lo menos aproximadamente 60%, de por lo menos aproximadamente 70%, de por lo menos aproximadamente 80%, o de por lo menos entre aproximadamente 90% y 95% del total de oligosacáridos. En todavía otra realización, la molécula de unión a antígeno o molécula variante de unión a antígeno producida mediante 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%, específciamente 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 de tipo híbrido o complejo. En todavía otra realización, la molécula de unión a antígeno o molécula variante de unión a antígeno producida mediante los métodos de la invención presenta una proporción incrementada de oligosacáridos bisectados 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 bisectados 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, los ABM producidos por las células huésped y mediante los métodos de la invención presentan una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc. Los oligosacáridos no fucosilados biantenarios pueden 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 aproximadamente 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 o molécula variante de unión a antígeno son no fucosilados biasectados. Los 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 del ABM son no fucosilados híbridos bisectados.

[0127] En otra realización, la presente invención se refiere a una molécula de unión a antígeno anti-CEA (por ejemplo un ABM variante) manipulado 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 la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) incrementada, la secreción de citoquinas incrementada, la incorporación incrementada de antígeno por parte de células presentadoras de antígeno mediada por complejo inmunológico, la unión a células NK incrementada, la unión a macrófagos incrementada, la unión a monocitos incrementada, la unión a células polimorfonucleares incrementada, la señalización directa inductora de apoptosis incrementada, el entrecruzamiento de anticuerpos unidos a diana incrementado, la maduración de células dendríticas incrementada o el cebado de células T incrementado. En una realización preferente, la unión a receptor de Fc incrementada es la unión incrementada a un receptor de Fc activador, más preferentemente FcγRIIIa. En una realización, la molécula de unión a antígeno o molécula variante 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 o molécula variante de unión a antígeno es un anticuerpo humanizado de afinidad madurada.

[0128] La presente invención proporciona además métodos para la generación y utilización de sistemas de células huésped para la producción de glucoformas de los ABMs de la presente invención, que presentan una afinidad de unión a receptor de Fc incrementada, preferentemente unión incrementada a receptores de Fc activadores y/o que presentan funciones efectoras incrementadas, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La metodología de glucomanipulación que puede utilizarse con los 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

como referencia en la presente memoria en su totalidad. Los ABMs de la presente invención alternativamente pueden glucomanipularse para que presenten una cantidad reducida de residuos 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, en las patentes WO nº 03/085119 y nº 03/085119 y en las solicitudes publicadas de patente US nº 2003/0115614, nº 2004/093621, nº 2004/110282, nº 2004/110704 y nº 2004/132140 (Kyowa). El contenido de cada uno de dichos documentos se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria. Los ABMs glucomanipulados de la invención también pueden producirse en sistemas de expresión que producen glucoproteínas modificadas, tales como las que se enseñan 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 su totalidad en la presente memoria.

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

[0129] En un aspecto, la presente invención proporciona sistemas de expresión de células huésped para la generación de los 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 los ABMs de la presente invención que presentan un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la invención proporciona sistemas de expresión de células huésped seleccionados o manipulados 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 heterólogo residente en Golgi. Específicamente, dichos sistemas de expresión de células huésped pueden manipularse para comprender una molécula recombinante de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII, operablemente ligada a un sistema promotor constitutivo o regulado.

[0130] 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 heterólogo residente en el Golgi. En un aspecto, la célula huésped se manipula con una molécula de ácidos nucleicos 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 el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi.

[0131] 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 ó células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales como línea celular de fondo para generar las células huésped manipuladas de la invención.

[0132] Se contempla que la invención comprenda cualquier célula huésped manipulada que exprese un polipéptido que presente actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII, incluyendo un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi tal como se define en la presente memoria.

[0133] Uno o varios ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII, pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulada. 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 presenten actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII, y que comprendan el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el Golgi, se encuentren comprendidos dentro del sistema de células huésped, algunas de ellas podrán expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otras se expresarán 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 la expresión de genes informadores o la medición de la actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo de la actividad de GnTIII. Alternativamente, puede utilizarse una lectina que se une a productos biosintéticos de GnTIII, por ejemplo la lectina E_4-PHA. Alternativamente, puede utilizarse un ensayo funcional que mide la unión incrementada de receptor de Fc o una función efectora incrementada mediada por anticuerpos producidos por las células manipuladas con el ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa, por ejemplo actividad de GnTIII.

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

[0134] Las células huésped que contienen la secuencia codificante de un ABM anti-CEA variante (por ejemplo un ABM humanizado de afinidad y/o estabilidad madurada) y que expresa los productos génicos biológicamente activos puede identificarse mediante por lo menos cuatro enfoques generales: (a) hibridación ADN-ADN o ADN-ARN, (b) la presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras", (c) la evaluación del nivel de transcripción medido mediante la expresión de los transcritos de ARNm respectivos en la célula huésped, y (d) la detección del producto génico medido mediante inmunoensayo o a partir de su actividad biológica.

[0135] En el primer enfoque, la presencia de la secuencia codificante de un anti-CEA variante y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) puede detectarse mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN utilizando sondas que comprenden las secuencias de nucleótidos que son homólogas de las secuencias codificantes respectivas, respectivamente, o partes o derivados de las mismas.

[0136] En el segundo enfoque, puede identificarse el sistema de vector de expresión recombinante/huésped y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de determinadas funciones génicas "marcadoras" (por ejemplo la actividad de timidina quinasa, la resistencia a antibióticos, la resistencia al metotrexato, un fenotipo de transformación, la formación de cuerpos de oclusión en baculovirus,

etc.). Por ejemplo, en el caso de que la secuencia codificante del ABM de la invención, o de un fragmento del mismo, y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) se inserten dentro de una secuencia génica marcadora del vector, los recombinantes que contienen 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 de promotores diferentes utilizados 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 del ABM de la invención y/o de la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII).

[0137] En el tercer enfoque, la actividad transcripcional de la región codificante del ABM de la invención, o de un fragmento del mismo y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) pueden evaluarse mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, puede aislarse el ARN y analizarse mediante transferencia northern utilizando una sonda homóloga de las secuencias codificantes del ABM de la invención, o de un fragmento de las mismas, y/o la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de glucosiltransferasa (por ejemplo GnTIII) o partes particulares de la misma. Alternativamente, pueden extraerse los ácidos nucleicos totales de la célula huésped y someterse a ensayo para la hibridación de dichas sondas.

[0138] 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 definitivo del éxito del sistema de expresión, sin embargo, implica la detección de los productos génicos biológicamente activos.

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

[0139] La invención también se refiere a un método para la localización *in vivo* o *in vitro* de células que expresan CEA Las células que expresan CEA pueden

localizarse con fines terapéuticos (por ejemplo para tratar un trastorno mediante la localización de células que expresan CEA para su destrucción por el sistema inmunológico). En una realización, la presente invención se refiere a un método para localizar células que expresan CEA en un sujeto, comprendiendo la administración en el sujeto de una composición que comprende un ABM de la invención. Las células que expresan CEA también pueden localizarse con fines diagnósticos (por ejemplo para determinar si expresan CEA, normal o anormalmente). De esta manera, la invención también se refiere 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 un ABM de la presente invención, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el ABM y el 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.

[0140] En un aspecto, los ABMs y/o ABMs variantes de la presente invención pueden utilizarse para localizar células *in vivo* o *in vitro* que expresan CEA. Las células que expresan CEA pueden localizarse con fines diagnósticos o terapéuticos. En un aspecto, los 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 la expresión en tejido no tumoral del mismo tipo celular. De esta manera, los ABMs y/o ABMs variantes 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 o metástasis tumorales. Los ABMs y/o ABMs variantes 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 diferenciación de las células diana. Los ABMs y/o ABMs variantes de la invención pueden utilizarse para tratar cualquier tumor que exprese CEA. Entre las malignidades particulares que pueden tratarse con los ABMs y/o ABMs variantes de

la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el cáncer colorrectal, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el cáncer gástrico, el cáncer pancreático y el cáncer de mama.

[0141] Los ABMs anti-CEA y/o ABMs variantes dados a conocer en la presente memoria pueden utilizarse para inhibir el crecimiento tumoral o para eliminar células tumorales. Por ejemplo, los ABMs anti-CEA pueden unirse a CEA que se encuentra sobre la membrana o la superficie celular de las células cancerosas e inducir, por ejemplo, la ADCC u otra eliminación de las células cancerosas mediada por efectores. Los ABMs anti-CEA y/o ABMs variantes pueden humanizarse, específicamente de afinidad y/o estabilidad madurada, más específicamente pueden ser glucomanipulados, de estabilidad y afinidad maduradas.

[0142] Los ABMs y/o ABMs variantes alternativamente pueden utilizarse solos 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 y las moléculas variantes de unión a antígeno pueden utilizarse para bloquear la adhesión celular mediada por el CEA.

[0143] Los ABMs anti-CEA y/o ABMs variantes de la invención se administran en un mamífero, preferentemente en un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, tal como las comentadas anteriormente, incluyendo aquéllas que pueden administrarse en un ser humano por vía intravenosa en forma de un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Los ABMs también se administran convenientemente por las vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, con el fin de ejercer efectos terapéuticos locales además de sistémicos. Se espera que la vía intraperitoneal resulte particularmente útil, por ejemplo en el tratamiento de los tumores colorrectales.

[0144] Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis correcta del ABM y/o ABM variante dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, de la severidad y curso de la enfermedad, de las terapias anteriores, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico responsable. El ABM convenientemente se administra en el paciente de una vez o en una serie de tratamientos.

[0145] La presente invención proporciona un método para eliminar selectivamente células tumorales que expresan el CEA. Este 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 el carcinoma colorrectal, el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), el carcinoma gástrico, el carcinoma pancreático y el carcinoma mamario.

[0146] En una realización, la presente invención proporciona un método para inhibir la adhesión celular mediada por CEA de una célula tumoral. Este método comprende poner en contacto dicha célula tumoral con las moléculas de unión a antígeno o moléculas variantes de unión a antígeno de la invención o los conjugados de las mismas. Estas células tumorales pueden proceder 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 mamario.

[0147] Además, la presente invención proporciona un método para tratar los carcinomas (por ejemplo los carcinomas humanos) *in vivo*. Este método comprende administrar en un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición que contiene por lo menos una de las moléculas de unión a antígeno o los inmunoconjugados (por ejemplo la inmunotoxina) de la invención.

[0148] En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar cánceres caracterizados por la sobreexpresión del CEA, incluyendo, aunque sin limitación, las células de cáncer colorrectal, NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas), células de cáncer gástrico, células de cáncer pancreático y células de cáncer mamario, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de las moléculas de unión a antígeno anti-CEA o moléculas variantes de unión a antígeno dadas a conocer en la presente memoria.

[0149] En una realización adicional, la invención se refiere a un método para inducir la regresión del tejido tumoral en un sujeto utilizando moléculas de unión a antígeno anti-CEA o moléculas variantes de unión a antígeno dadas a conocer en la presente memoria. Entre los ejemplos no limitativos de tejido tumoral se incluyen tumor colorrectal, tumor pulmonar de células no pequeñas, tumor gástrico, tumor

pancreático y tumor mamario. En una realización particular, el tejido tumoral es un tumor colorrectal.

[0150] 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 incluidos en la presente invención.

[0151] La invención proporciona además métodos para inhibir el crecimiento de las células tumorales, tratar un tumor en un sujeto y tratar una enfermedad de tipo proliferativo en un sujeto. Estos métodos comprenden la administración en el sujeto de una cantidad efectiva de la composición de la invención.

[0152] En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de las moléculas de unión a antígeno anti-CEA o molécula variantes de unión a antígeno dadas a conocer en la presente memoria para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad relacionada con la expresión anormal del CEA. En una realización particular, la enfermedad es un cáncer que sobreexpresa el CEA, incluyendo, aunque sin limitación, tumor colorrectal, tumor pulmonar de células no pequeñas, tumor gástrico, tumor pancreático y tumor mamario. En una realización particular, el tumor es un tumor colorrectal.

Conjugados de moléculas de unión a antígeno anti-CEA

[0153] La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un ABM anti-CEA o ABM variante en la presente memoria conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo proteínas toxinas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o isótopos radioactivos.

[0154] En una realización, un inmunoconjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, incluyendo, aunque sin limitación, un maitansinoide (ver las patentes US nº 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea nº EP 0 425 235 B1); una auristatina, tal como las fracciones DE y DF de fármaco monometillauristatina (MMAE y MMAF) (ver las patentes US nº 5.635.483 y nº 5.780.588 y nº 7.498.298), una dolastatina, una caliqueamicina o

derivado de la misma (ver patentes US nº 5.712.374, nº 5.714.586, nº 5.739.116, nº 5.767.285, nº 5.770.701, nº 5.770.710, nº 5.773.001 y nº 5.877.296; Hinman *et al.*, Cancer Res. 53:3336-3342, 1993, y Lode *et al.*, Cancer Res. 58:2925-2928, 1998; una antraciclina tal como daunomicina o doxorrubicina (ver Kratz *et al.*, Current Med. Chem. 13:477-523, 2006; Jeffrey *et al.*, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362, 2006; Torgov *et al.*, Bioconj. Chem. 16:717-721, 2005; Nagy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834, 2000; Dubowchik *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532, 2002; King *et al.*, J. Med. Chem. 45:4336-4343, 2002; y la patente US nº 6.630.579); metotrexato, vindesina, un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno, y CC1065.

[0155] En otra realización, un inmunoconjugado comprende un ABM anti-CEA o ABM variante tal como se indica en la presente memoria conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, aunque sin limitación, cadena A diftérica, fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

[0156] En otra realización, un inmunoconjugado comprende un ABM anti-CEA o ABM variante tal como se indica en la presente memoria conjugado con un átomo radioactivo para formar un conjugado radioactivo. Se encuentra disponible una diversidad de isótopos radioactivos para la producción de conjugados radioactivos. Entre los ejemplos se incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y los isótopos radioactivos de Lu. En el caso de que el conjugado radioactivo se utilice para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo tc99m o I^{123}, o un marcaje de espín para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes por resonancia magnética, RMI), tal como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0157] Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico se preparan utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como

propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexán-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238:1098, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Ver la patente WO nº 94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un conector lábil a los ácidos, un conector sensible a la peptidasa, un conector fotolábil, un conector dimetilo o un conector que contenga disulfuros (Chari *et al.*, Cancer Res. 52:127-131, 1992; patente US nº 5.208.020).

[0158] Los inmunoconjugados o ADCs en la presente memoria contemplan expresamente, aunque sin limitación, los conjugados preparados con reactivos de entrecruzamiento, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), que se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo de Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA).

Composiciones, formulaciones, dosis y vías de administración

[0159] En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los ABMs anti-CEA o ABMs variantes 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 enfermedades, tales como el cáncer.

Concretamente, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad, y más particularmente, para el tratamiento del cáncer, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención.

[0160] 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 comprenden una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0161] 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 la administración directamente en el tumor. La administración intravenosa resulta preferente.

[0162] En un aspecto de la invención, las formulaciones terapéuticas que contienen los ABMs de la invención se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla de un anticuerpo que presenta el grado de pureza deseado 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 resultan no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas.

[0163] 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.

[0164] El modo de administración y régimen de dosificación más efectivos 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. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las dosis de las composiciones deben titularse adaptándose al paciente individual. Sin embargo, una dosis efectiva 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.

[0165] Las moléculas indicadas en la presente memoria pueden encontrarse en una diversidad de formas de dosificación, incluyendo, aunque sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusionables. La forma preferente depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

[0166] La composición que comprende un ABM de la presente invención se formula, dosifica y administra de un modo consistente con las buenas prácticas médicas. Entre los factores para la consideración 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 por los profesionales médicos. La cantidad terapéuticamente efectiva del antagonista que debe administrarse se regulará a partir de dichas consideraciones.

Artículos fabricados

[0167] En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo fabricado que contiene materiales que resultan útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos indicados anteriormente. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el paquete sobre el recipiente o asociado al mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución I.V., etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta, por sí misma o en combinación con otra composición, efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición, y puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presente un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto

en el paquete indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección. Además, el artículo fabricado puede comprender: (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico adicional u otro agente de otro modo terapéutico. El artículo fabricado en la presente realización de la invención puede comprender además un prospecto en el paquete que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y para el usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0168] Se entiende que cualquiera de los artículos fabricados anteriormente indicados puede incluir un inmunoconjugado de la invención en sustitución o adicionalmente a un ABM anti-CEA.

[0169] Los ejemplos posteriormente explican la invención en mayor detalle. Las preparaciones y ejemplos siguientes se proporcionan para permitir que el experto en la materia entienda más claramente y ponga en práctica la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada en su alcance a 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 aquéllas descritas en la presente invención se pondrán de manifiesto al experto en la materia a partir de la descripción anterior y dibujos adjuntos. Dichas modificaciones se pretende que se encuentren comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

[0170] A menos que se indique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos aminoácidos en los Ejemplos, a continuación, siguen el sistema de numeración de Kabat.

Ejemplo 1

Generación de bibliotecas de maduración de afinidad

Biblioteca de H1/H2

[0171] Para la generación de una biblioteca de maduración de afinidad aleatorizada en la región 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 (SEC ID nº 123) y EAB-679 (SEC ID nº 127) que contiene las posiciones aleatorizadas de CDR1 (fig. 11). Utilizando el mismo molde, los cebadores MS-56 (SEC ID nº 126) y MS-52 (SEC ID nº 124) amplificaron un segundo fragmento (fragmento 2) que presentaba una región solapante con el extremo 3' del fragmento 1. Entre las condiciones de amplificación se incluyeron una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguido de 25 ciclos, consistiendo cada uno de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, de hibridación durante 1 minuto a 55ºC y de alargamiento durante 20 segundos y 50 segundos a 72ºC, para los fragmentos 1 y 2, respectivamente. Se llevó a cabo al final una última etapa de incubación de 10 minutos a 72ºC. Ambos fragmentos se purificaron en un gel de agarosa. Una PCR solapante de extensión con los fragmentos 1 y 2 utilizando los cebadores MS-43 (SEC ID nº 123) y EAB-680 (SEC ID nº 128), que incluía 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 fragmento 1 y fragmento 2. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguido de 5 ciclos sin incubadores, consistiendo cada ciclo de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 40 segundos a 72ºC. Tras la adición de los cebadores exteriores, 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 por PCR utilizando nuevamente pMS22 como molde y los cebadores MS-55 (SEC ID nº 125) y MS-52 (SEC ID nº 124). Tras la purificación en gel, una extensión final por PCR solapante con 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 inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguido de 5 ciclos sin incubadores, consistiendo cada ciclo de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 80 segundos a 72ºC. Tras la adición de los cebadores exteriores, 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 la digestión con NcoI/NheI.

Biblioteca de L1/L2

[0172] Para la generación de una biblioteca de maduración de afinidad aleatorizada en la región LCDR1 y LCDR2, se aleatorizaron los tripletes que codificaban 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 (SEC ID nº 129) y EAB-681 (SEC ID nº 133) que contiene las posiciones aleatorizadas de CDR1 (fig. 12). Utilizando el mismo molde, los cebadores EAB-686 (SEC ID nº 130) y EAB-687 (SEC ID nº 131) amplificaron un segundo fragmento (fragmento 2) que presentaba una región solapante con el extremo 3' del fragmento 1. Entre las condiciones de amplificación se incluyeron una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguida de 25 ciclos, consistiendo cada uno de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, de hibridación durante 1 minuto a 55ºC y de alargamiento durante 60 segundos a 72ºC, para los fragmentos 1 y 2, respectivamente. Se llevó a cabo al final una última etapa de incubación de 10 minutos a 72ºC. Ambos fragmentos se purificaron en un gel de agarosa. Una PCR solapante de extensión con los fragmentos 1 y 2 utilizando los cebadores EAB-685 (SEC ID nº 129) y EAB-682 (SEC ID nº 134), que incluía 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 fragmento 1 y fragmento 2. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguido de 5 ciclos sin incubadores, consistiendo cada ciclo de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72ºC. Tras la adición de los cebadores exteriores, 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 por PCR utilizando nuevamente pMS22 como molde y los cebadores EAB-688 (SEC ID nº 132) y EAB-687 (SEC ID nº 131). Tras la purificación en gel, una extensión final mediante PCR solapante utilizando los fragmentos 3 y 4 como moldes y los cebadores EAB-685 (SEC ID nº 129) y EAB-687 (SEC ID nº 131) 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 inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguido de 5 ciclos sin incubadores, consistiendo cada ciclo de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 80 segundos a 72ºC. Tras la adición de los cebadores exteriores, se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales utilizando los mismos parámetros. A continuación, este fragmento se ligó con pMS22 tras la digestión con HindIII/SacI.

Bibliotecas de H3

[0173] Para la generación de bibliotecas de maduración de afinidad aleatorizadas en la región HCDR3, se aleatorizaron 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 de H3). Para la aleatorización de la región HCDR3, los fragmentos se amplificaron por PCR utilizando un cebador que se hibridaba con

el extremo 3' de CL y los cebadores que incluyen las secuencias aleatorizadas de HCDR3 (fig. 13). A continuación, se llevó a cabo una extensión mediante PCR solapante con un segundo fragmento que se solapaba con el extremo 3' del fragmento 1, y comprendía el extremo de VH y la región 5' de CH1. A continuación, los fragmentos ensamblados se ligaron en pMS22 tras la digestión con SacI/NheI. Para la generación de la biblioteca agrupada de H3, diez fragmentos de ADN se amplificaron por PCR separadamente utilizando cada uno de los cebadores AC7-AC16 (SEC ID nº 135, SEC ID nº 144) en combinación con el cebador EAB-749 (SEC ID nº 146). Para la generación de la biblioteca completa de L3, se utilizaron los cebadores AC17 (SEC ID nº 145) y EAB-749 (SEC ID nº 146). Se utilizó el plásmido pMS22 como molde. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguida de 25 ciclos, consistiendo cada uno de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 36 segundos a 72ºC, seguida de una etapa final de incubación de 10 minutos a 72ºC. Lo anterior resultó en fragmentos de aproximadamente 580 pb de longitud que se purificaron en un gel de agarosa. Para la extensión por PCR solapante, se amplificó un segundo fragmento utilizando el cebador EAB-750 (SEC ID nº 147) o EAB-751 (SEC ID nº 148) en combinación con EAB-752 (SEC ID nº 149). Aunque el cebador EAB-750 (SEC ID nº 147) presentaba una secuencia solapante con los cebadores de aleatorización AC7-11 (SEC ID nº 139), EAB-751 (SEC ID nº 148) compartía homologías de secuencia con los cebadores de aleatorización AC12-17 (SEC ID nº 140-145). Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguida de 25 ciclos, consistiendo cada uno de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 12 segundos a 72ºC, seguida de una etapa final de incubación de 10 minutos a 72ºC. Los fragmentos resultantes presentaban una longitud de aproximadamente 180 pb. Para el ensamblaje de ambos fragmentos, se utilizaron cantidades equimolares de fragmento 1 y el fragmento correspondiente 2. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguido de 5 ciclos sin incubadores, consistiendo cada ciclo de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 60 segundos a 72ºC. Tras la adición

de los cebadores exteriores EAB-749 (SEC ID nº 146) y EAB-752 (SEC ID nº 149), se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales utilizando los mismos parámetros. Al final, se llevó a cabo al final una etapa final de incubación de 10 minutos a 72ºC. A continuación, se ligaron los fragmentos purificados en gel en pMS22 tras la digestión con SacI/NheI y las ligaciones purificadas se transformaron en bacterias TG1 mediante electroporación.

Bibliotecas de L3

[0174] Para la generación de bibliotecas de maduración de afinidad aleatorizadas en la región CDR3 de la cadena ligera, los tripletes codificantes de las posiciones Y91, Y92, T93, Y94 y L95a se aleatorizaron 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 de L3). Para la generación de las cinco sub-bibliotecas, cinco fragmentos de ADN se amplificaron por PCR utilizando cada uno de los cebadores AC1-AC5 (SEC ID nº 150-154) en combinación con el cebador MS43 (SEC ID nº 123). Para la generación de la biblioteca completa de L3, se utilizó la combinación de cebadores AC6 (SEC ID nº 155) y MS43 (SEC ID nº 123) (fig. 14). Se utilizó el plásmido pMS22 como molde. Las condiciones de amplificación incluían una etapa inicial de incubación de 5 minutos a 94ºC, seguida de 25 ciclos, consistiendo cada uno de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94ºC, una etapa de hibridación de 1 minuto a 55ºC y una etapa de alargamiento de 25 segundos a 72ºC, seguida de una etapa final de incubación de 10 minutos a 72ºC. 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 por PCR adicional. Todas las reacciones se llevaron a cabo con el cebador EAB-746 (SEC ID nº 156), que presentaba una secuencia solapante con los cebadores de aleatorización MS43 (SEC ID nº 123) utilizando las condiciones indicadas anteriormente. Los fragmentos purificados, así como pMS22, fueron digeridos con NcoI/XhoI. En las cinco sub-bibliotecas, se ligaron 0,5 µg de inserción con 0,5 µg de pAC16. Para la biblioteca completa de L3, la ligación se llevó a cabo con 9,8 µg de inserción y 9,8 µg de

pMS22. Las ligaciones purificadas se transforaron en bacterias TG1 mediante electroporación.

Generación de los antígenos

[0175] Debido a que los anticuerpos PR1A3 tanto murinos como humanizados reconocen únicamente CEA humano unido a membrana y no CEA liberado, se generó una proteína quimérica recombinante que contenía el epítopo de PR1A3 para la maduración *in vitro* de la afinidad de PR1A3 humanizado (SEC ID nº 7 y nº 8). La generación de esta 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, el cual contiene el epítopo de PR1A3. Como resultado, la secuencia codificaba una proteína híbrida que comprendía los dominios N y A1 de BGP, el dominio B3 del CEA y el dominio A2 de BGP (N-A1-B3-A2, NABAhu). A continuación, este producto de fusión se unió a la parte Fc de la IgG1 humana (NABAhu-Fc) (Steward *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-306, 1999) o se fusionó con una secuencia codificante del sitio de corte de proteasa de precisión, una etiqueta avi y una etiqueta (His)6 (NABAhu-avi-his) (SEC ID nº 158). Se purificó NABAhu-Fc a partir del sobrenadante de una línea celular CHO establemente transfectada utilizando una columna de proteína A. Se transfectó transitoriamente NABAhu-avis-his (SEC ID nº 158) en células HEK293, expresando establemente la proteína EBNA derivada del EBV. Un plásmido cotransfectado simultáneamente codificante de una biotina ligasa permitió la biotinilación *in vivo* específica de la etiqueta avi. A continuación, se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) seguido de filtración en gel.

Maduración de afinidad de PR1A3 humanizado

[0176] La generación de Fabs de PR1A3 humanizado de afinidad madurada se llevó a cabo mediante expresión fágica mediante 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 ~10^{12} partículas fagémidas de cada biblioteca de maduración de afinidad con NABAhu-avis-his biotinilado 100 nM durante 0,5 horas en un volumen total de 1 ml. 2. Captura de NABAhu-avis-his biotinilado y partículas fágicas específicamente unidas mediante la adición de 5,4x10^7 perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, durante 10 minutos; 3. lavado de las perlas utilizando 5-10x 1 ml de PBS/Tween20 y 5-10x 1 ml de PBS; 4. elución de partículas fágicas mediante la adición de 1 ml de TEA (trietilamina) 100 mM durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris 1 M/HCl, pH 7,4, y 5. reinfección de bacterias *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial, infección con fago ayudante VCSM13 y posterior precipitación con PEG/NaCl de las partículas fagémidas que debían utilizarse en rondas de selección posteriores. Las selecciones se llevaron a cabo en 3 a 5 rondas utilizando concentraciones de antígeno constantes o decrecientes (de 10^{-7} M a 2x10^{-9} M). En la ronda 2, captura del antígeno: se formaron complejos de fagos utilizando placas con neutravidina en lugar de perlas con estreptavidina. Se identificaron los ligantes específicos mediante ELISA del modo siguiente: 100 µl de NABAhu-avis-his biotinilado 10 nM en cada pocillo se recubrieron sobre placas con neutravidina. Se añadieron sobrenadantes bacterianos que contenían Fab y se detectaron los Fabs ligantes a partir de sus etiquetas Flag mediante la utilización de un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Se expresaron en bacterias los clones positivos en el ELISA en forma de fragmentos Fab solubles en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se sometieron a un experimento de cribado cinético utilizando un BIACORE T100. Se identificaron los clones que expresaban Fabs con las constantes de afinidad más altas y se secuenciaron los fagémidos correspondientes.

Purificación de Fabs y medición de los parámetros cinéticos

[0177] Para el análisis exacto de los parámetros cinéticos, se purificaron Fabs a partir de cultivos bacterianos. Se inoculó un cultivo de 500 ml y se indujo con IPTG 1 mM a una DO_{600} de 0,9. Las bacterias se incubaron a 25ºC 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. Esta etapa de incubación se repitió una vez con 25 ml de una solución 5 mM de $MgSO_4$. Los sobrenadantes de ambas etapas de incubación se agruparon, 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 las columnas PD10 (GE Healthcare). Los parámetros cinéticos de los Fabs purificados seguidamente se estudiaron mediante análisis de PSR en serie de dilución de 200 nM a 6,25 nM.

Ejemplo 2

[0178] El anticuerpo PR1A3 se quimerizó para preparar una región constante de IgG1/kappa humana y se expresó utilizando la tecnología GlycoMab con el fin de disponer de un alto grado de azúcares afucosilados en la región Fc. Se compararon los anticuerpos glucomanipulados y no glucomanipulados a una proporción de efector a diana de 25:1. La cantidad máxima de eliminación de células diana dependiente de anticuerpos se duplicó mediante 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).

[0179] Se humanizó PR1A3 utilizando marcos idénticos a las secuencias de línea germinal humana. La secuencia de IMGT IGHV7-4-1*02 (nº de acceso X62110) era el aceptor de VH humanizado y IMGT_hVK_1_39 (nº de acceso X59315) era el aceptor para la humanización de VL. 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 mostraron una unión satisfactoria a células de carcinoma de colon humano medida mediante citometría de flujo (figura 3).

[0180] Se llevó a cabo una maduración de la afinidad de PR1A3 mediante expresión fágica utilizando protocolos estándares descritos 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 de L1/L2, se mantuvieron constantes las posiciones valina 29, alanina 50 ó serina 51 dentro de las CDRs. Para la biblioteca de H1/H2, se mantuvieron constantes las posiciones isoleucina 51, glicina 55 ó alanina 57 dentro de las CDRs (figuras 4 y 5).

[0181] 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 emparejaron con los constructos parentales de región variable de cadena ligera y de región variable de cadena pesada, respectivamente, y entre sí. Todos los anticuerpos se convirtieron en IgG1/kappa humana y se midió mediante citometría de flujo la unión a la línea celular CEA-positiva MKN45. Los anticuerpos que comprendían una región variable de cadena pesada o ligera de afinidad madurada o ambas regiones variables de cadena pesada o ligera de afinidad madurada mostraron una característica de unión mejorada 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 maduradas contribuyen independientemente a una afinidad incrementada. El anticuerpo parental CH7A CL1A presenta la intensidad de señal más baja, así como el valor de EC_{50} más alto en las figuras 6 y 15. La cadena ligera madurada desplazaba los valores de EC_{50} a valores más bajos, mientras que las cadenas pesadas maduradas (rF9 en la figura 6, y rB9 en la figura 15) desplazaron la intensidad de señal de fluorescencia total en una medición mediante 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 todavía más. Además, tal como se muestra en la figura 16, la mejora de la afinidad conduce a una mejora de las características de ADCC.

[0182] Las afinidades de unión de las CDRs de las cadenas pesada y ligera de afinidad madurada se determinaron mediante Biacore y se listan en las figuras 34A y B.

[0183] La FIGURA 35 resume las constantes de afinidad para las diversas secuencias de anticuerpo de afinidad madurada. Se lista el anticuerpo PR1A3 parental, así como varias combinaciones de cadena ligera y cadena pesada de secuencias maduradas y no maduradas. Todos los valores se obtuvieron mediante

tecnología Biacore mediante la medición de las constantes de tasa de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) de los diversos constructos de anticuerpo solubles en formato Fab en un chip Biacore con reactivo NABA-avi-his inmovilizado (SEC ID nº 158) como antígeno. La constante de afinidad se indica como K_D.

Ejemplo 3

[0184] El marco aceptor utilizado para generar los anticuerpos anti-CEA de afinidad madurada indicado en el Ejemplo 2 era de la clase VH7 humana. Con el fin de incrementar la estabilidad, se utilizó una secuencia de marco aceptor más estable como base para la manipulación de la estabilidad del anticuerpo. Basándose en la homología de las secuencias del anticuerpo PR1A3 murino y la premisa de que las secuencias derivadas de VH1 deberían presentar una estabilidad intrínseca más alta que VH7, o los números pares de los clanes de VH humano (Ewert S., Hubert T., Honegger A. y Plückthun A., J. Mol. Biol. 325:531-553, 2003), se utilizó la secuencia IGHV-1-18, nº de acceso M99641, como el nuevo marco aceptor. La injertación convencional del bucle de CDR del anticuerpo PR1A3 condujo a la generación del constructo CH1A (SEC ID nº 279). Desafortunadamente, esta molécula no mostraba una actividad de unión significativa hacia el antígeno CEA. Se comparó la actividad de unión de este constructo con la actividad de unión del anticuerpo quimérico PR1A3 que incluía dominios variables derivados de ratón a diversas concentraciones. Se utilizaron células BxPC3 para la unión específica de los anticuerpos a CEA y se midió la intensidad de unión mediante análisis FACS. Figura 17.

[0185] Con el fin de recuperar la afinidad de unión, se introdujeron varias retromutaciones en la secuencia de CH1A para generar las nuevas cadenas pesadas CH1A1 (SEC ID nº 257) , CH1A2 (SEC ID nº 258), CH1A3 (SEC ID nº 259) y CH1A4 (SEC ID nº 260). CH1A1 incluye la mutación puntual doble M69F/T71L. Las últimas tres variantes presentan los marcos completos 1, 2 ó 3, respectivamente, sustituidos por la contrapartida murina. La figura 18 muestra la unión de dichos constructos emparejados con la cadena ligera 2F1 (SEC ID nº 209). En este ensayo, se analizó a diversas concentraciones la unión celular de las variantes de anticuerpo basadas en CH1A a células MKN-45 expresantes de CEA. La cadena ligera 2F1 de afinidad madurada era idéntica en todos los anticuerpos

sometidos a ensayo excepto por el anticuerpo parental en el que se utilizó la cadena ligera original CL1A. Se determinó la fluorescencia media mediante análisis FACS. La figura 19 muestra las estabilidades de dichos constructos emparejados con la cadena ligera 2F1, medidas mediante dispersión lumínica dinámica (DLS) de las muestras. Se llevó a cabo el ensayo DLS utilizando 1 mg/ml de los anticuerpos en un tampón de histidina 20 mM y NaCl 140 mM a pH 6,0. El ensayo se llevó a cabo partiendo de 25ºC con un incremento de la temperatura en etapas de 0,05ºC/minuto hasta alcanzar 70ºC. Todos los anticuerpos analizados en este ensayo presentaban 2F1 como la cadena ligera.

[0186] Debido a que CH1A1 todavía mantenía la estabilidad original y también mostraba cierta unión significativa (aunque algo menos que CH1A4, que era de afinidad más alta aunque de menor estabilidad), se seleccionó este constructo para la optimización adicional de la unión. Se generaron las nuevas cadenas pesadas CH1A1A (SEC ID nº 261), CH1A1B (SEC ID nº 262), CH1A1C (SEC ID nº 263), CH1A1D (SEC ID nº 264), CH1A1E (SEC ID nº 265), CH1A1F (SEC ID nº 266) y CH1A1G (SEC ID nº 267). Éstas esencialmente son variantes de CH1A1 con sólo unas cuantas retromutaciones en las regiones FR1 y FR3. Las figuras 20 y 21 muestran que todas sus afinidades son comparables, aunque todavía ligeramente inferiores al constructo humanizado CH7A basado en VH7. La figura 20 muestra sensogramas de Proteon (Biacore) obtenidos para la unión de las variantes de marco basadas en CH1A1 a la proteína quimérica NABA que porta antígeno CEA. Se inmovilizó NABA biotinilado sobre un chip recubierto con neutravidina y se utilizaron anticuerpos como analitos a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 nM. Se incluyeron el clon precursor CH1A1 y el anticuerpo parental CH7A para la comparación directa. La cadena ligera 2F1 era idéntica para todos los anticuerpos sometidos a ensayo. La figura 21 muestra la intensidad de unión de las siete variantes basadas en CH1A1 que portan mutaciones de marco adicionales. Los anticuerpos se incubaron con las células MKN45 expresantes de CEA en una serie de concentraciones y se midió la intensidad de unión mediante análisis de FACS. Se incluyó el clon precursor CH1A1 para la comparación directa. Todos los anticuerpos sometidos a ensayo en el ensayo presentaban 2F1 como la cadena ligera. Se seleccionaron las variantes CH1A1A y CH1A1B como variantes finales de

la inmunización basada en VH1 basándose en sus rendimientos de purificación comparativamente superiores y su comportamiento monomérico.

Ejemplo 4

[0187] Los residuos de CDR-H3 que habían sido seleccionados en el procedimiento de maduración de afinidad se introdujeron individualmente en la secuencia de PR1A3 para someter a ensayo una estabilidad incrementada del anticuerpo. Figura 36.

[0188] La FIGURA 22 muestra las mediciones de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la afinidad (medida en la forma bivalente) de cada anticuerpo hacia el antígeno CEA (reactivo NABA tal como describen Stewart *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:299-306, 1999). En la figura 22 se muestran sensogramas de Proteon (Biacore) obtenidos para la unión de las variantes de anticuerpo CDR-H3 a la proteína quimérica NABA que porta antígeno CEA. Se inmovilizó NABA biotinilado sobre un chip recubierto con neutravidina y se utilizaron anticuerpos como analitos a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 nM. Se incluyeron el clon precursor 5HFF12 de afinidad madurada y el anticuerpo parental CH7A para la comparación directa. Todos los anticuerpos sometidos a ensayo presentaban 2F1 como la cadena ligera. La variante CH7A (W95Y) no mostrada actividad medible en este ensayo; todas las demás variantes mostraban afinidades para la diana similares en un factor de diez. La afinidad relativa de cada una, medida en la forma bivalente, era la siguiente: 5HFF12 > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (Y98A) > CH7A > CH7A (E102Q) > CH7A (D99Y) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (V101F) > CH7A (W95Y).

[0189] Se llevó a cabo el análisis de DLS de los anticuerpos en comparación con su precursor 5HFF12 y el anticuerpo parental que portaba la cadena pesada CH7A. La cadena ligera 2F1 era idéntica para todos los anticuerpos analizados en el presente experimento. Figuras 23 y 24. Los resultados de este análisis proporcionaron la ordenación por niveles de estabilidad siguiente: CH7A (D99Y) > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (V101F) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (W95Y) > CH7Ax2F1 (= PR1A3) > 5HFF12. Se llevó a cabo el ensayo DLS utilizando 1 mg/ml de los anticuerpos en un tampón de histidina 20 mM y NaCl 140

mM a pH 6,0. El ensayo se llevó a cabo partiendo de 25ºC, con un incremento de la temperatura en etapas de 0,05ºC/minuto hasta alcanzar 70ºC.

[0190] Se seleccionó el doble mutante (Y98A/D99Y) (SEC ID nº 223) para una manipulación adicional de la estabilidad, ya que mostraba una estabilidad elevada conservando una afinidad elevada para la diana CEA.

Ejemplo 5

[0191] El doble mutante (Y98A/D99Y) del derivado humanizado de PR1A3, CH7A, se introdujo en las variantes finales de los constructos de humanización basados en VH1, CH1A1A y CH1A1B.

[0192] Se obtuvieron sensogramas de Proteon (Biacore) para la unión de las variantes combinadas de marco y CDR-H3 con la proteína quimérica NABA portadora de antígeno CEA. Se inmovilizó NABA biotinilado sobre un chip recubierto con neutravidina y se utilizaron anticuerpos como analitos a concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 0 nM. Se incluyeron el clon precursor 5L1A10 y el anticuerpo parental CH7A para la comparación directa. Todos los anticuerpos sometidos a ensayo en el presente ensayo presentaban 2F1 como la cadena ligera. Figura 25.

Ejemplo 6

[0193] Los constructos CH1A1A y CH1A1B mostraban actividad de ADCC. La ADCC mediada por las variantes CH1A1A y CH1A1B, su variante precursora CH1A1 y la variante parental CH7A, se midió tras 4 horas a partir de la liberación de lactato deshidrogenasa utilizando las células MKN45 como células diana (T) y PBMC humanas como células efectoras (E) a proporciones E:T de 25:1. La liberación de lactato deshidrogenasa es proporcional a la lisis de las células diana y se muestra como porcentaje de citotoxicidad. Figura 26. Se confirmó la actividad de ADCC de dichas variantes mediante medición de la liberación de calceína utilizando las células MKN45 como células diana (T) y las PBMCs humanas como células efectoras (E) a proporciones E:T de 25:1. La liberación de la calceína es

proporcionan a la lisis de las células diana y se muestra como porcentaje de citotoxicidad, valores de media ± desviación estándar. Figura 27.

[0194] También se observó actividad de ADCC para los constructos CH1A1A y CH1A1B que contenían CDRH3 de afinidad madurada con la doble mutación Y98A/D99Y. Se midió la ADCC mediada por las variantes combinadas de marco y CDR-H3 y el anticuerpo parental portador de CH7A, tras 24 horas a partir de la liberación de lactato deshidrogenasa utilizando células MKN45 (figura 28) o LS174T (figura 29) como células diana y PBMCs humanas como células efectoras a proporciones E:T de 5:1. Aunque las células MKN45 expresan CEA a niveles elevados, la expresión de CEA es moderada en las células LS174T. La liberación de la lactato deshidrogenasa es proporcional a la lisis de las células diana y se muestra como porcentaje de citotoxicidad. Todos los anticuerpos sometidos a ensayo en los ensayos de ADCC presentaban 2F1 como la cadena ligera.

[0195] La FIGURA 38 muestra las alineaciones de secuencia de aminoácidos de regiones VH de diversos anticuerpos anti-CEA de estabilidad madurada.

[0196]

Ejemplo 7

[0197] La versión glucomanipulada del anticuerpo anti-CEA que comprende la cadena pesada CH1A1A (98/99) y la cadena ligera 2F1 se sometió a ensayo para su eficacia en un modelo de xenoinjerto de carcinoma colorrectal en ratones SCID transgénicos para CD16 humano. Las condiciones de ensayo del modelo se proporcionan posteriormente. Los resultados del ensayo indican que este anticuerpo anti-CEA proporciona un beneficio de supervivencia en comparación con un control de vehículo. Figura 30.

[0198] **Animales:** Los ratones SCID CD16 transgénicos hembra; de 7 a 9 semanas de edad al inicio del experimento (adquiridos de Charles River, Francia) se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad de acuerdo con directrices convenidas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y autorizado por las autoridades administrativas locales. Tras su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para su aclimatación y observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo periódico de su estado de salud.

[0199] **Cultivo celular y aplicación:** Se cultivaron células LS174T (células de carcinoma de colon humano; European Collection of Cell Culture) en medio DMEM que contenía FCS al 10% (PAA Laboratories, Austria). Las células se cultivaron a 37ºC en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO_2. Se utilizó el pase 24 *in vitro* para la inyección intraesplénica, con una viabilidad de 97%.

[0200] **Inyección de células tumorales**: El día de la inyección, se recolectaron células tumorales LS174T de los matraces de cultivo (Greiner Bio-One) utilizando tripsina-EDTA (Gibco, Suiza) y se transfirieron a 50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se resuspendieron en medio AIM V (Gibco, Suiza). Se realizó una pequeña incisión en el sitio abdominal izquierdo de ratones SCID/beige anestesiados. Se abrió la piel y el músculo y se inyectaron treinta microlitros ($3x10^6$ células LS174T en medio AimV) de suspensión celular en el ápex del bazo. Se suturó en primer lugar el músculo y después la piel abdominal con sutura absorbible (Monosyn® 3-0, Braun).

[0201] **Tratamiento:** Todos los anticuerpos anti-CEA y el vehículo correspondiente se administraron i.v. una vez a la semana. Tres dosis en total. Se administraron 625 µg de anticuerpo en cada inyección en cada ratón. Las diluciones de anticuerpo se prepararon frescas a partir de solución madre antes de la utilización y se formularon en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 a una concentración de anticuerpo de 4,38 mg/ml.

Ejemplo 8

[0202] La versión glucomanipulada del anticuerpo anti-CEA que comprendía la cadena pesada CH1A1A (Y98/D99Y) y la cadena ligera 2F1 se sometió a ensayo para su eficacia en un modelo de xenoinjerto de carcinoma pulmonar A549 en ratones SCID transgénicos para CD16 humano. Las condiciones de ensayo del modelo se proporcionan posteriormente. Los resultados del ensayo indican que este anticuerpo anti-CEA proporciona un beneficio de supervivencia dependiente de la dosis en comparación con un control de vehículo. Figura 31.

[0203] **Animales:** Se mantuvieron treinta y cinco ratones SCID CD16 transgénicos hembra; de 7 a 9 semanas de edad al inicio del experimento (Charles River, Francia) bajo condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad de acuerdo con directrices convenidas

(GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y autorizado por las autoridades administrativas locales. Tras su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para su aclimatación y observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo periódico de su estado de salud.

[0204] **Cultivo celular y aplicación**: Se cultivaron células A549 (células NSCLC humanas; American Tissue Culture Collection) en medio DMEM que contenía FCS al 10% (PAA Laboratories, Austria). Las células se cultivaron a 37ºC en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO_2.

[0205] **Tratamiento:** Los ratones recibieron inyección i.v. el día de estudio 0 con $1x10^6$ célula A549. Se inició la administración de anticuerpo el día de estudio 7 y se continuó con 2 inyecciones semanales adicionales.

Grupos de tratamiento:

Ratones: 35 ratones SCID-CD16Tg, N=7 en cada grupo.

Células: células A549, 5 millones/ratón

Compuesto y programa terapéutico:

Vehículo 3q7d

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (500 µg) 3q7d (25 mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (200 µg) 3q7d (10 mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (100 µg) 3q7d (5 mg/kg)

CH1A1A(Y98A/D99Y) x 2F1 (50 µg) 3q7d (1 mg/kg)

[0206] Aunque la invención anteriormente expuesta ha sido descrito en cierto detalle a título ilustrativo y ejemplar para los fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. Las exposiciones de toda la literatura de patentes y científica citadas en la presente memoria se incorporan expresamente en su totalidad como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Molécula variante de unión a antígeno (ABM) que se une al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana, en la que el ABM es estable a una temperatura que es por lo menos 0,5, 1,0, 1,5 ó 2,0 grados centígrados superior a la que lo es el anticuerpo PR1A3 ó una versión humanizada del anticuerpo PR1A3.

2. ABM según la reivindicación 1, en el que el incremento de estabilidad se mide utilizando un ensayo de dispersión lumínica dinámica.

3. ABM según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo PR1A3 ó versión humanizada del anticuerpo PR1A3 es una versión humanizada del anticuerpo PR1A3 que comprende la región variable de cadena pesada CH7A (SEC ID nº 101) y la región variable de cadena ligera 2F1 (SEC ID nº 209).

4. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ABM comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

una 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 y SEC ID nº 12,

una 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

una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224.

5. ABM según la reivindicación 4, en el que el ABM comprende una región variable de cadena ligera que comprende:

una 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, y

una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 46, 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

una CDR3 de cadena ligera de SEC ID nº 56.

6. ABM según la reivindicación 5, en el que la región variable de cadena pesada comprende:

la CDR1 de cadena pesada de SEC ID nº 1,

la CDR2 de cadena pesada de SEC ID nº 13,

una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224, y

en el que la región variable de cadena ligera comprende:

la CDR1 de cadena ligera de SEC ID nº 39,

la CDR2 de cadena ligera de SEC ID nº 49, y

la CDR3 de cadena ligera de SEC ID nº 56.

7. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el ABM comprende los residuos de marco de CH1A1A (SEC ID nº 261) o CH1A1B (SEC ID nº 262).

8. ABM según la reivindicación 7, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amioácidos que es por lo menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242 y SEC ID nº 247 y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la secuencia SEC ID nº 209.

9. Molécula variante de unión a antígeno (ABM) que se une al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana, en la que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243 y SEC ID nº 247,

y en la que la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 209.

10. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el ABM comprende una región Fc.

11. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ABM 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.

12. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ABM se une al mismo epítopo, o es capaz de competir para la unión con el mismo epítopo, que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3.

13. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ABM se une a CEA unido a membrana con una Kd de 100 nM, 10 nM, 1 nM o inferior.

14. Anticuerpo aislado que se une a CEA unido a membrana, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

una 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 y SEC ID nº 12,

una 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

una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224,

en el que el anticuerpo es estable a una temperatura que es por lo menos 0,5, 1,0, 1,5 ó 2,0 grados centígrados superior a la que lo es el anticuerpo PR1A3 ó versión humanizada del anticuerpo PR1A3.

15. Anticuerpo según la reivindicación 14, en el que el incremento de estabilidad se mide mediante un ensayo de dispersión lumínica dinámica.

16. Anticuerpo según la reivindicación 14 ó 15, en el que el anticuerpo PR1A3 ó versión humanizada del anticuerpo PR1A3 es una versión humanizada del anticuerpo PR1A3 que comprende la región variable de cadena pesada CH7A (SEC ID nº 101) y la región variable de cadena ligera 2F1 (SEC ID nº 209).

17. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende:

una 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, y

una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 46, 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

una CDR3 de cadena ligera de SEC ID nº 56.

18. Anticuerpo según la reivindicación 17, en el que la región variable de cadena pesada comprende:

la CDR1 de cadena pesada de SEC ID nº 1,

la CDR2 de cadena pesada de SEC ID nº 13,

una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 217, SEC ID nº 218, SEC ID nº 219, SEC ID nº 220, SEC ID nº 221, SEC ID nº 222, SEC ID nº 223 y SEC ID nº 224, y

en el que la región variable de cadena ligera comprende:

la CDR1 de cadena ligera de SEC ID nº 39,

la CDR2 de cadena ligera de SEC ID nº 49, y

la CDR3 de cadena ligera de SEC ID nº 56.

19. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que el anticuerpo comprende los residuos de marco de CH1A1A (SEC ID nº 261) o CH1A1B (SEC ID nº 262).

20. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de amioácidos que es por lo menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243 y SEC ID nº 247 y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la secuencia SEC ID nº 209.

21. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en el que las realizaciones de anticuerpo se unen al mismo epítopo, o son capaces de competir para la unión con el mismo epítopo, que el anticuerpo monoclonal murino PR1A3.

22. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en el que el ABM se une a CEA unido a membrana con una Kd de 100 nM, 10 nM, 1 nM o inferior.

23. Anticuerpo que se une al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) unido a membrana, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 233, SEC ID nº 234, SEC ID nº 235, SEC ID nº 239, SEC ID nº 241, SEC ID nº 242, SEC ID nº 243 y SEC ID nº 247, y en la que la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 209.

24. ABM según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 ó anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, en el que el ABM o anticuerpo comprende una región Fc que ha sido glucomanipulada.

25. ABM o anticuerpo según la reivindicación 24, en el que por lo menos entre aproximadamente 20% y aproximadamente 100% de los oligosacáridos N-ligados en dicha región Fc no se encuentran fucosilados.

26. ABM o anticuerpo según la reivindicación 24, en el que por lo menos entre aproximadamente 20% y aproximadamente 100% de los oligosacáridos N-ligados en dicha región Fc son bisectados.

27. ABM o anticuerpo según la reivindicación 24, en el que por lo menos entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50% de los oligosacáridos N-ligados en dicha región Fc son bisectados no fucosilados.

28. ABM o anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en el que el ABM o anticuerpo presenta por lo menos una función efectora incrementada.

29. ABM o anticuerpo según la reivindicación 28, en el que por lo menos una función efectora incrementada se selecciona de entre el grupo que consiste de: afinidad de unión a receptor de Fc incrementada, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) incrementada, unión a células NK incrementada, unión a macrófagos incrementada, unión a monocitos incrementada, unión a células polimorfonucleares incrementada, señalización directa inductora de apoptosis, maduración de células dendríticas incrementada y cebado de células T incrementado.

30. ABM o anticuerpo según la reivindicación 29, en el que el ABM o anticuerpo presenta una ADCC incrementada de entre por lo menos aproximadamente 40% y aproximadamente 100% en comparación con la molécula parental de unión a antígeno no glucomanipulada.

31. Polinucleótido aislado codificante del ABM o anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

32. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 31.

33. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 32.

34. Composición que comprende el ABM o anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 y un portador farmacéuticamente aceptable.

35. Método de inducción de lisis celular de una célula tumoral, comprendiendo el método poner en contacto la célula tumoral con el AMB o anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 ó la composición según la reivindicación 34.

36. Método según la reivindicación 35, en el que la 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.

37. Método según la reivindicación 35, en el que la lisis celular resulta inducida por la citotoxicidad dependiente de anticuerpos del ABM o anticuerpo.

38. Método de tratamiento de un sujeto que presenta un cáncer que expresa anormalmente CEA, comprendiendo el método la administración en el sujeto de una

cantidad terapéuticamente efectiva del ABM o anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 ó de la composición según la reivindicación 34.

39. Método de incremento del tiempo de supervivencia en un sujeto que presenta un cáncer que expresa anormalmente CEA, comprendiendo el método la administración en el sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del ABM o anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 o de la composición según la reivindicación 34.

40. Método según la reivindicación 38 ó 39, en el que el 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.

41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, en el que el ABM o anticuerpo o composición se administra en combinación con quimioterapia o terapia de radiación.

42. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 41, en el que el sujeto es un ser humano.

43. Utilización del ABM o anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 ó de la composición según la reivindicación 34, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto que presenta un cáncer que expresa niveles anormales de CEA.

44. Utilización según la reivindicación 43, en el que el 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.

45. Invención tal como se ha descrito en la presente memoria.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 12-07-13 (30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País*** 11156665.9 02-03-11 EP	(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: 02-10-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: *29-02-12* No. de solicitud: ***PCT/EP2012/053390***	(87) Publicación internacional Fecha: ***07-09-12*** No. publicación: ***WO 2012/117002 A1***
(54) Titulo: **"ANTICUERPOS DEL CEA"**	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno (ABMs) que se unen a CEA unido a membrana, incluyendo ABMS con propiedades terapéuticas mejoradas, y métodos de utilización de las mismas.

Sector: Biotecnología, específicamente anticuerpos monoclonales recombinantes incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados que se unen al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y composiciones que los contienen, útiles para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama.

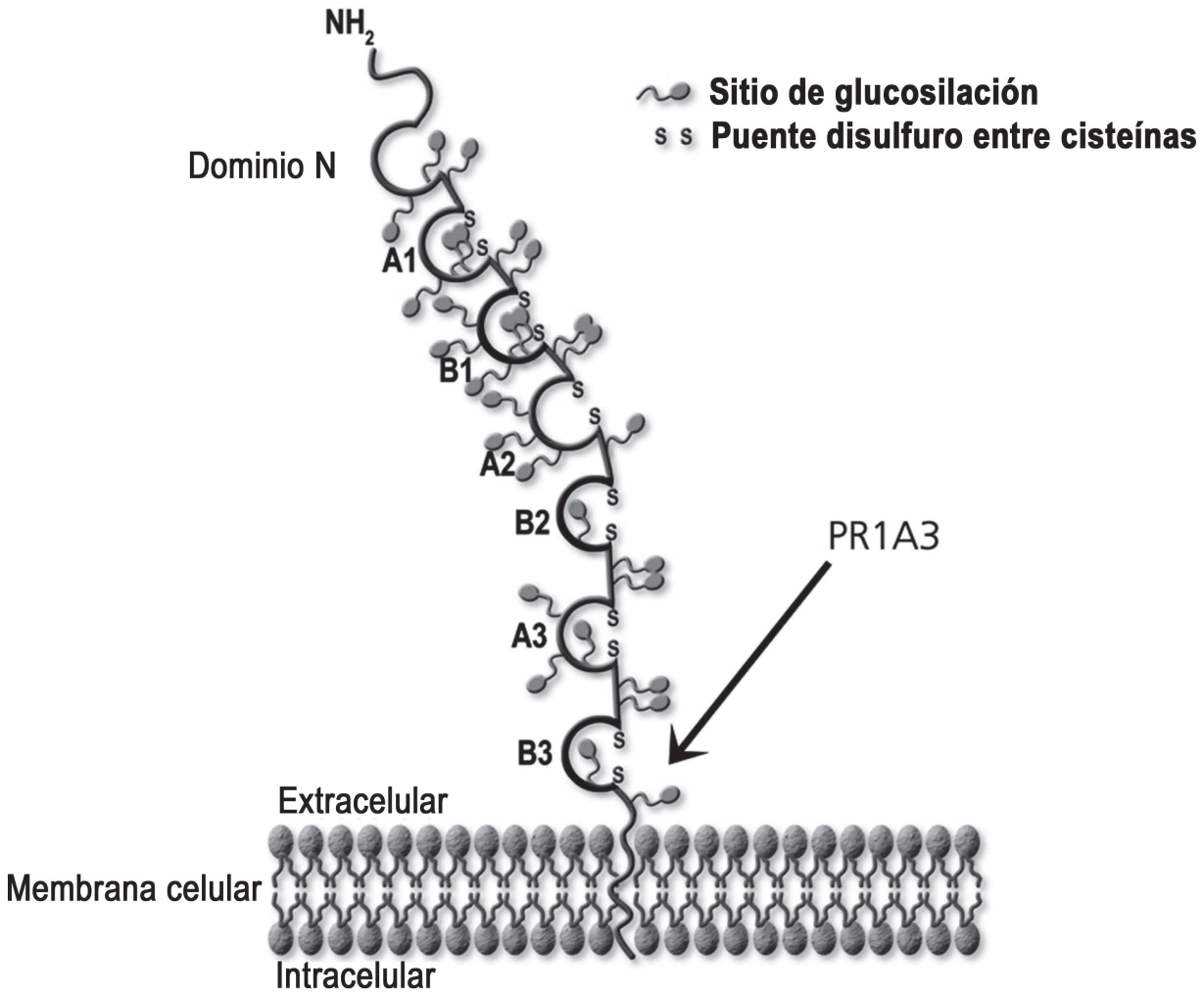

NH2
Sitio de glucosilación
S S Puente disulfuro entre cisteínas
Dominio N
A1
B1
A2
B2
A3
B3
PR1A3
Extracelular
Membrana celular
Intracelular

Fig. 1

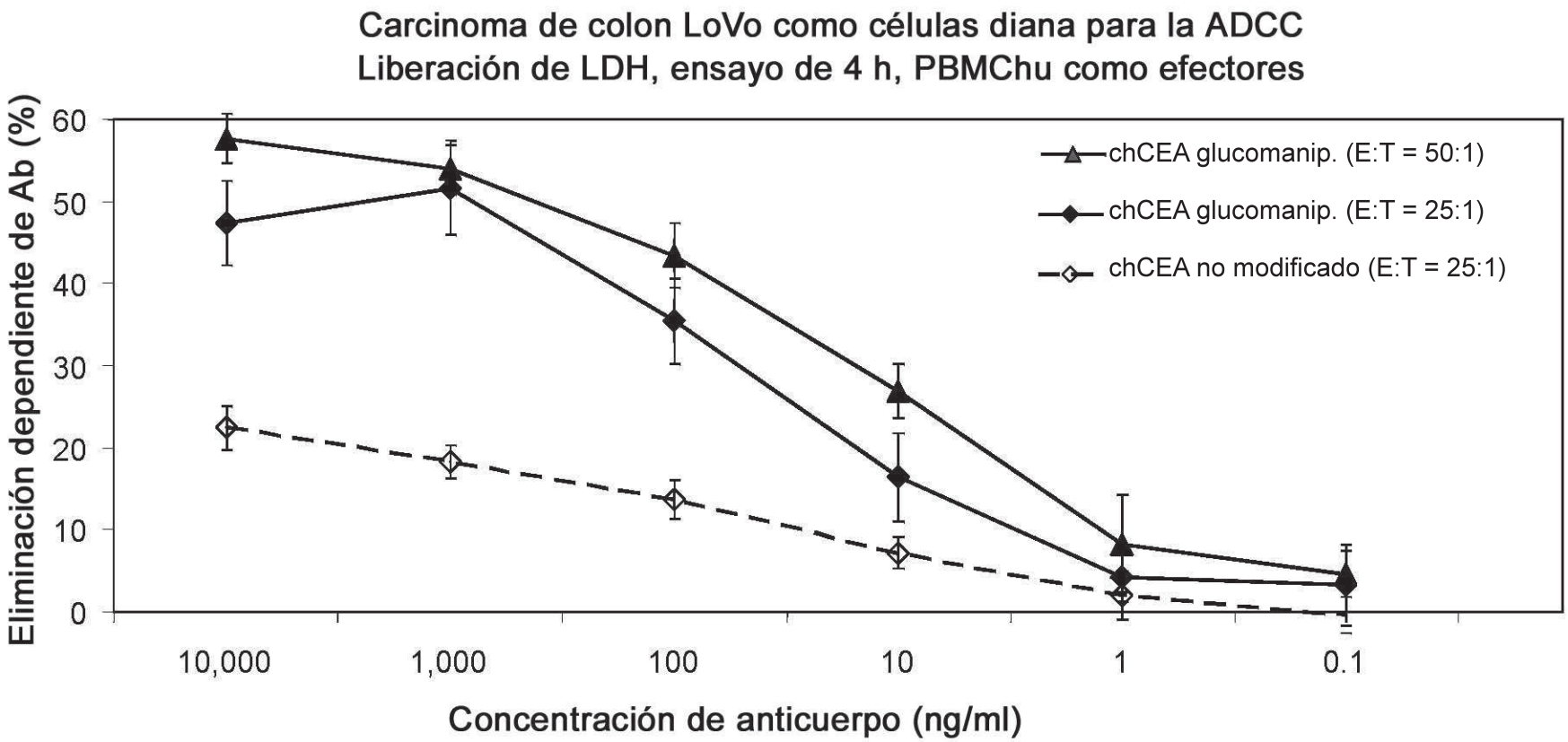

Carcinoma de colon LoVo como células diana para la ADCC
Liberación de LDH, ensayo de 4 h, PBMChu como efectores
Eliminación dependiente de Ab (%)
60
50
40
30
20
10
0
10,000
1,000
100
10
1
0.1
Concentración de anticuerpo (ng/ml)
chCEA glucomanip. (E:T = 50:1)
chCEA glucomanip. (E:T = 25:1)
chCEA no modificado (E:T = 25:1)

Fig. 2

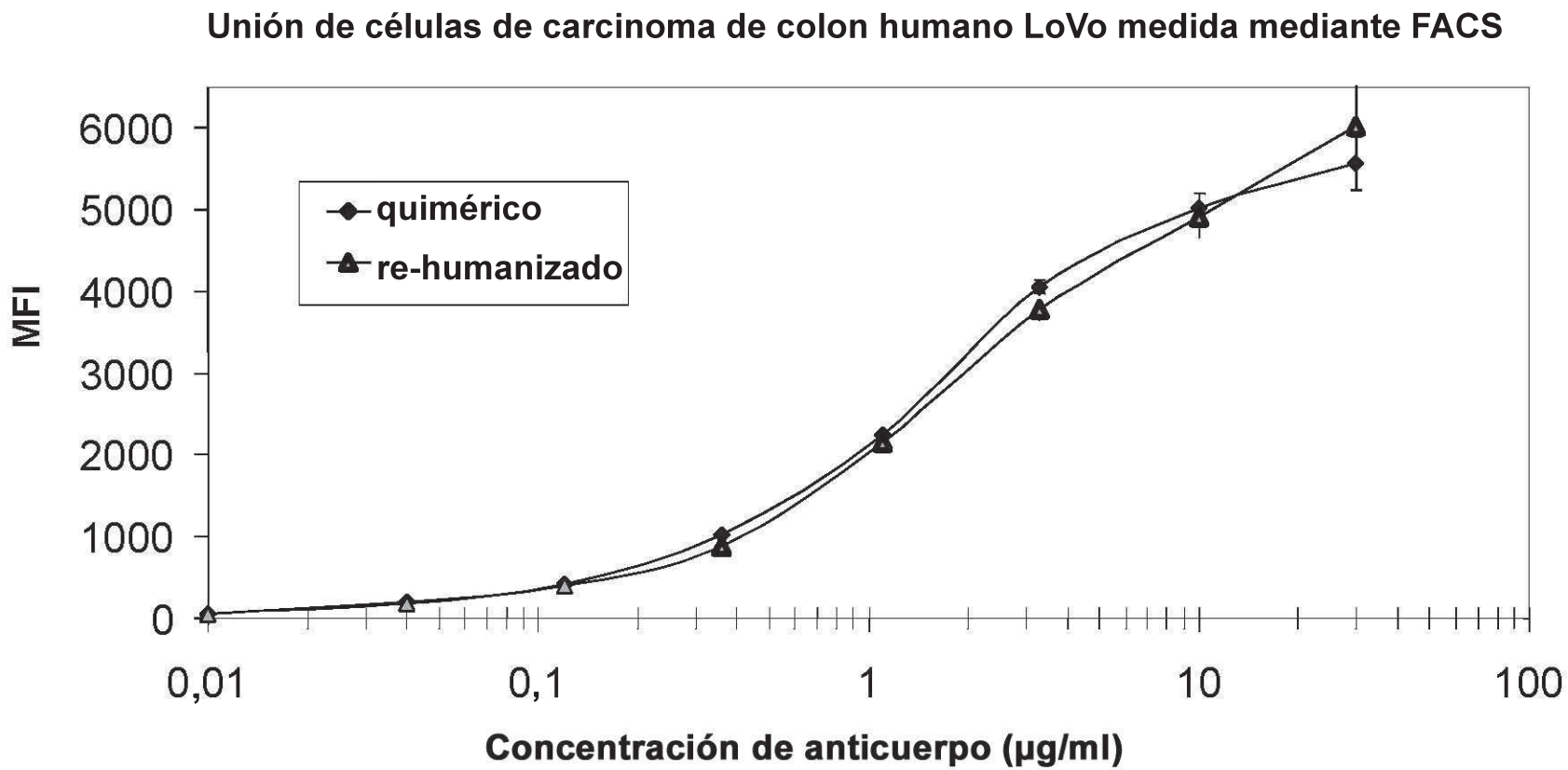

Unión de células de carcinoma de colon humano LoVo medida mediante FACS
MFI
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
quimérico
re-humanizado
0,01
0,1
1
10
100
Concentración de anticuerpo (µg/ml)

Fig. 3

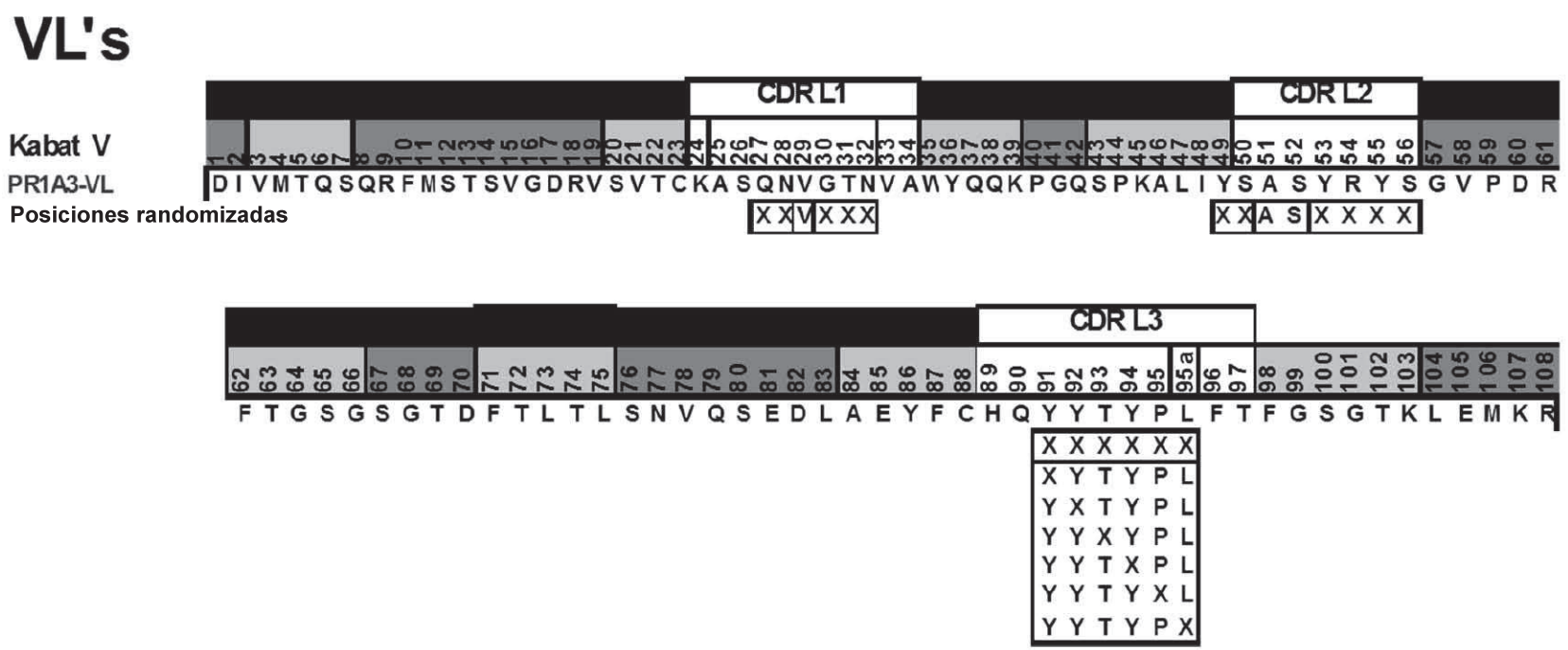

VL's
CDR L1
CDR L2
CDR L3
Kabat V
PR1A3-VL
Posiciones randomizadas
D I V M T Q S Q R F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y Q Q K P G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S G V P D R
X X V X X X
X X A S X X X X
F T G S G S G T D F T L T L S N V Q S E D L A E Y F C H Q Y Y T Y P L F T F G S G T K L E M K R
X X X X X X
X Y T Y P L
Y X T Y P L
Y Y X Y P L
Y Y T X P L
Y Y T Y X L
Y Y T Y P X

Fig. 4

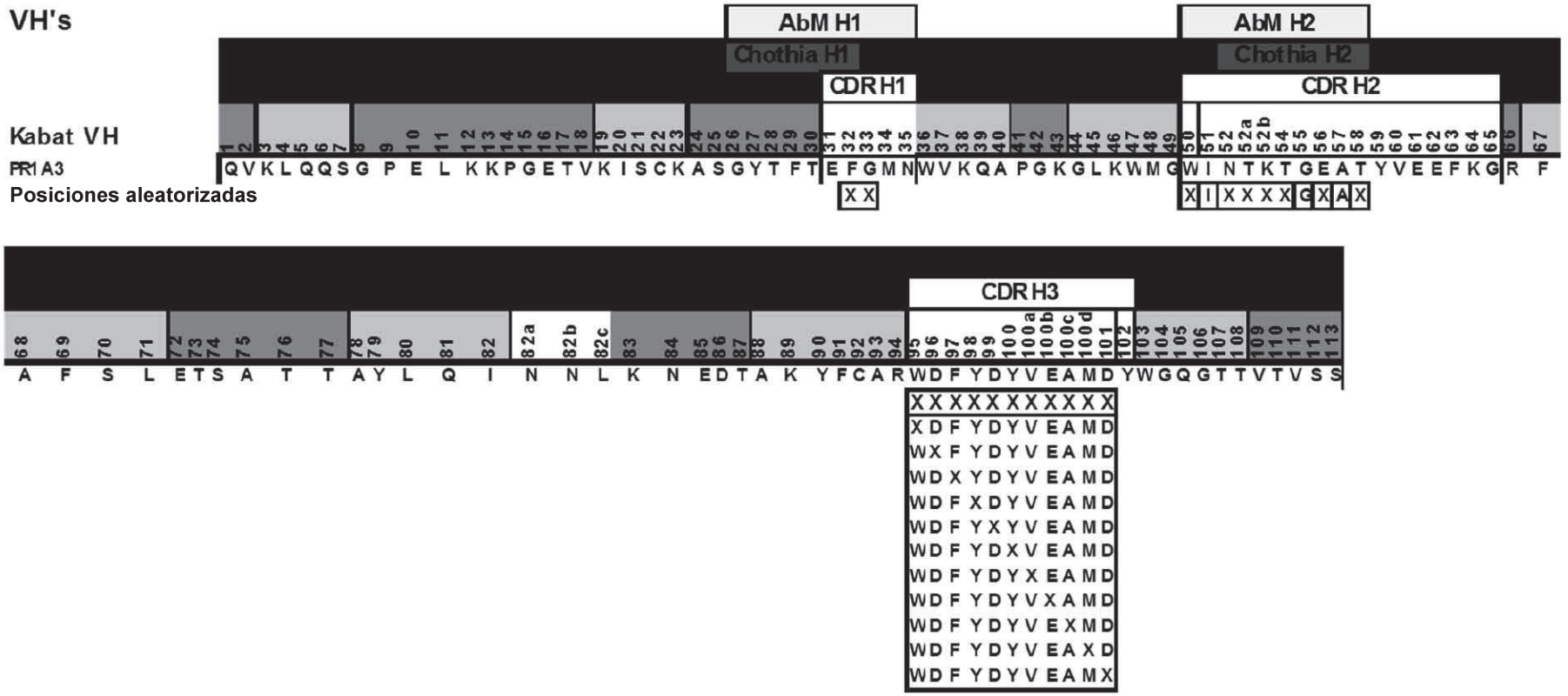

VH's
AbM H1
AbM H2
Chothia H1
Chothia H2
CDR H1
CDR H2
Kabat VH
PR1A3
Posiciones aleatorizadas
CDR H3

Fig. 5

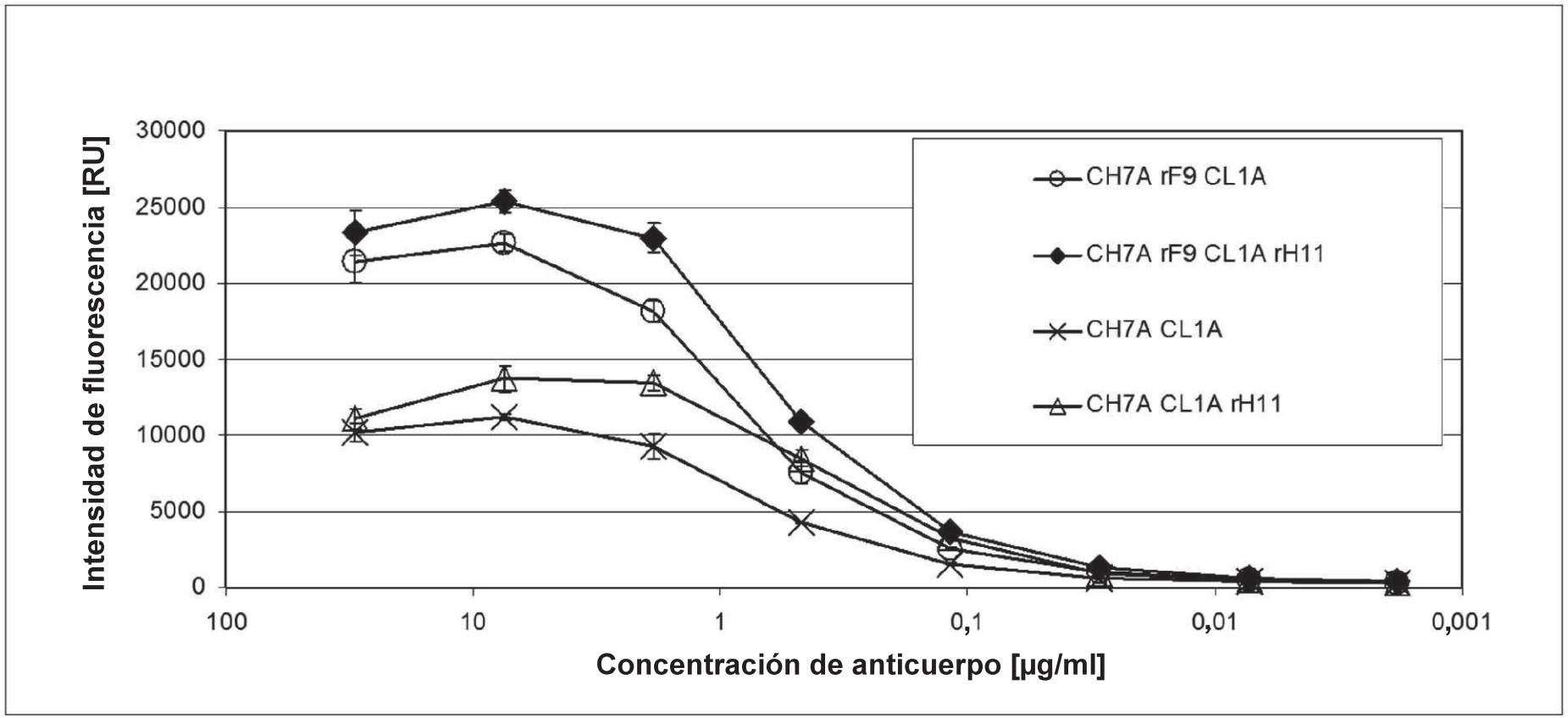

Intensidad de fluorescencia [RU]
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
100
10
1
0,1
0,01
0,001
Concentración de anticuerpo [µg/ml]
CH7A rF9 CL1A
CH7A rF9 CL1A rH11
CH7A CL1A
CH7A CL1A rH11

Fig. 6

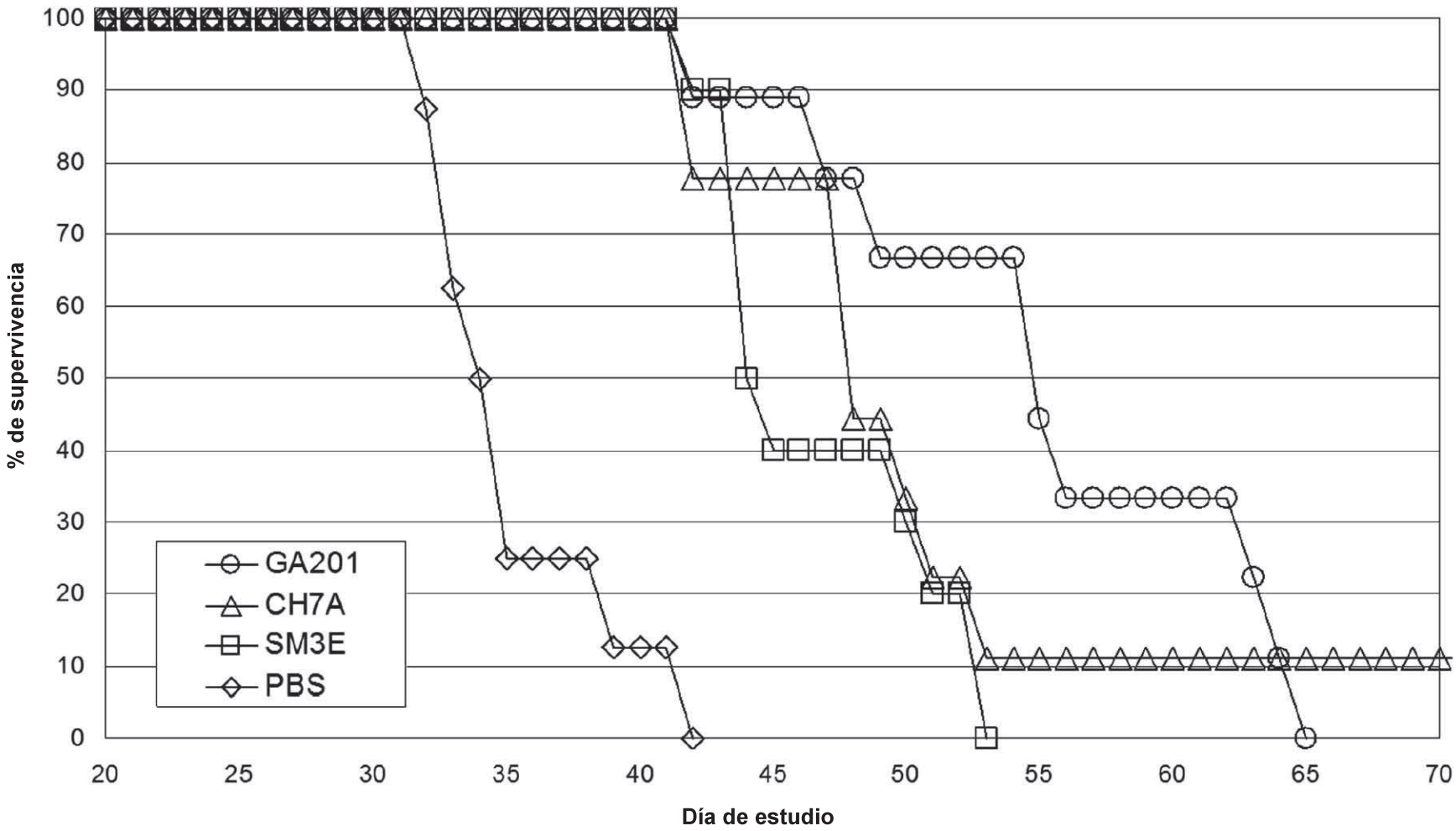

Modelo de metástasis hepática LS174T
% de supervivencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
Día de estudio
GA201
CH7A
SM3E
PBS

Fig. 7

Modelo de metástasis pulmonar A549

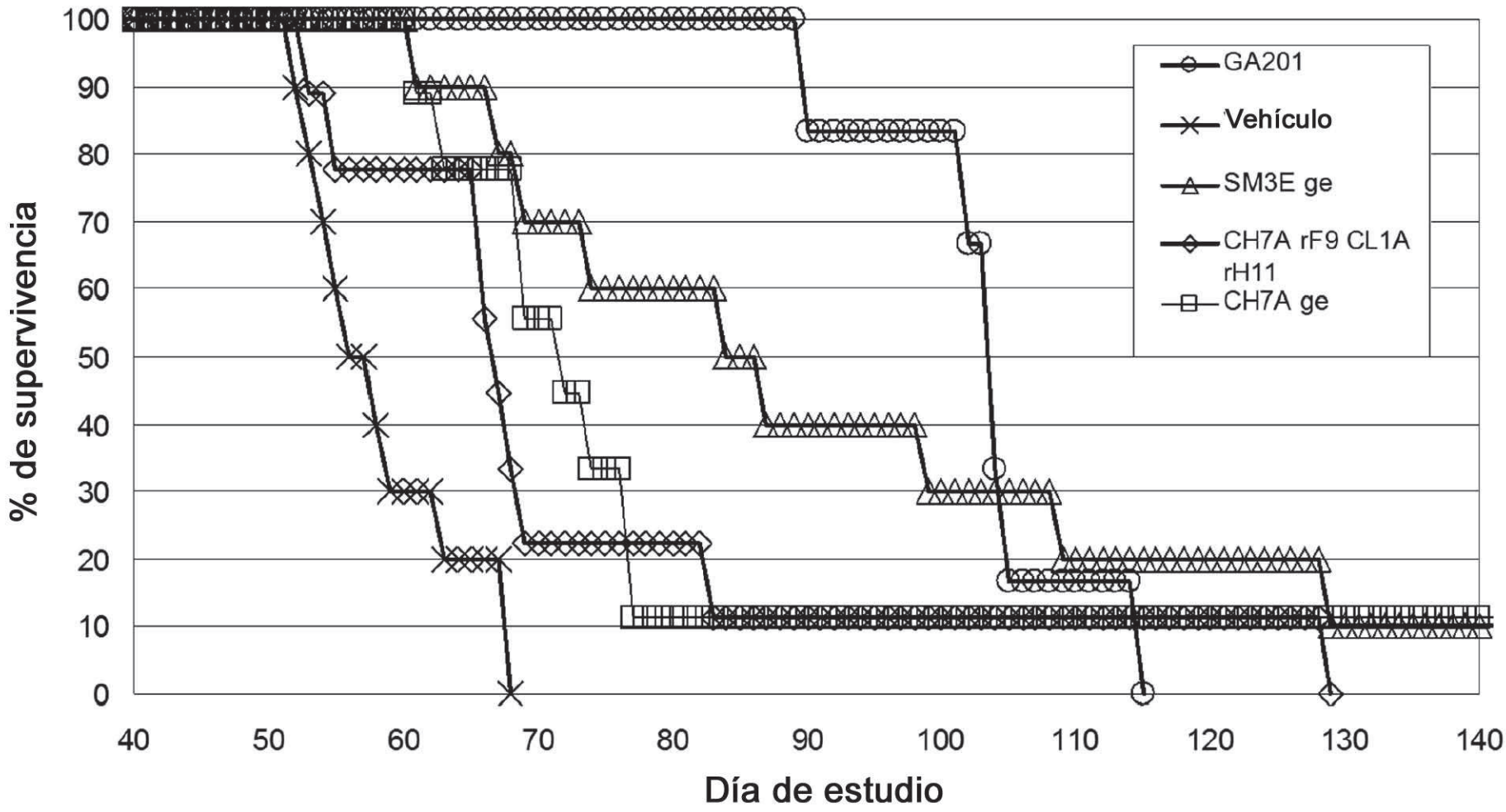


Fig. 8

Modelo de metástasis hepática MKN45

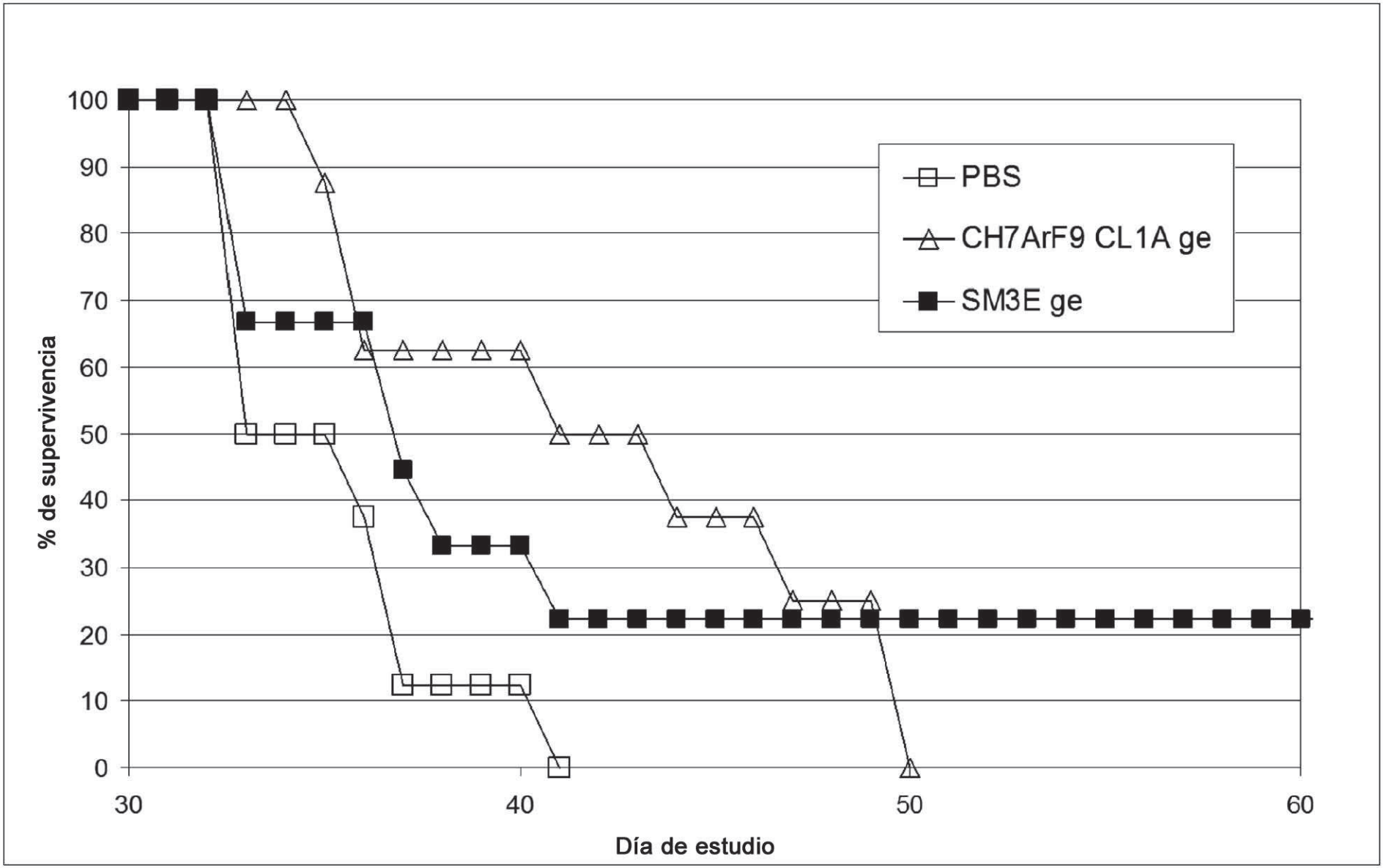


Fig 9

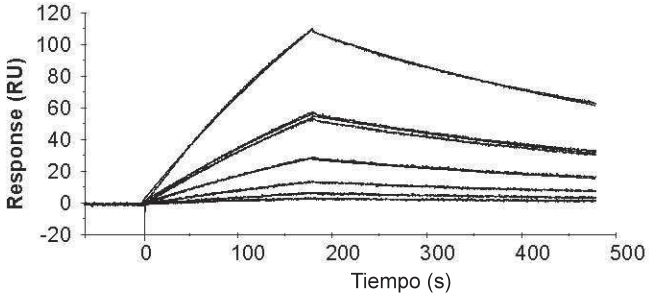
Sensograma de Fabs anti-CEA

CH7A H4E9 CL1A

k_{on}: 0.527 x 10^3

k_{off}: 0.0027

KD: 518 nM

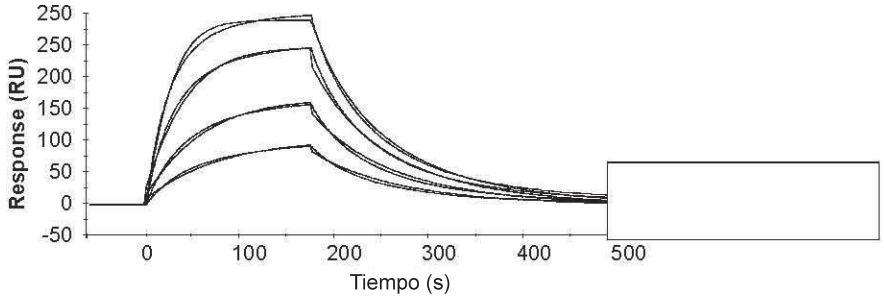


CH7A CL1A pAC18

k_{on}: 9.57 x 10^4

k_{off}: 0.0206

KD: 216 nM



CH7A H4E9 CL1A pAC18

k_{on}: 3.64 x 10^4

k_{off}: 0.0035

KD: 96 nM

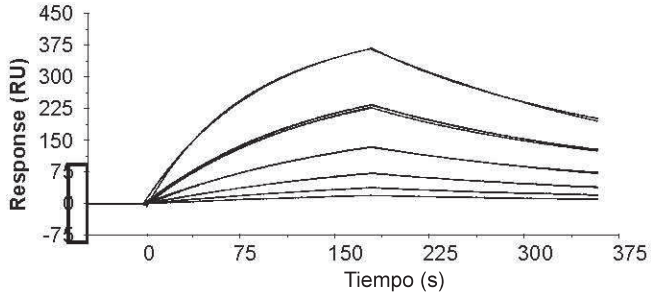


Fig. 10

aleatorización de CDR1 y CDR2 VH (CH7A)

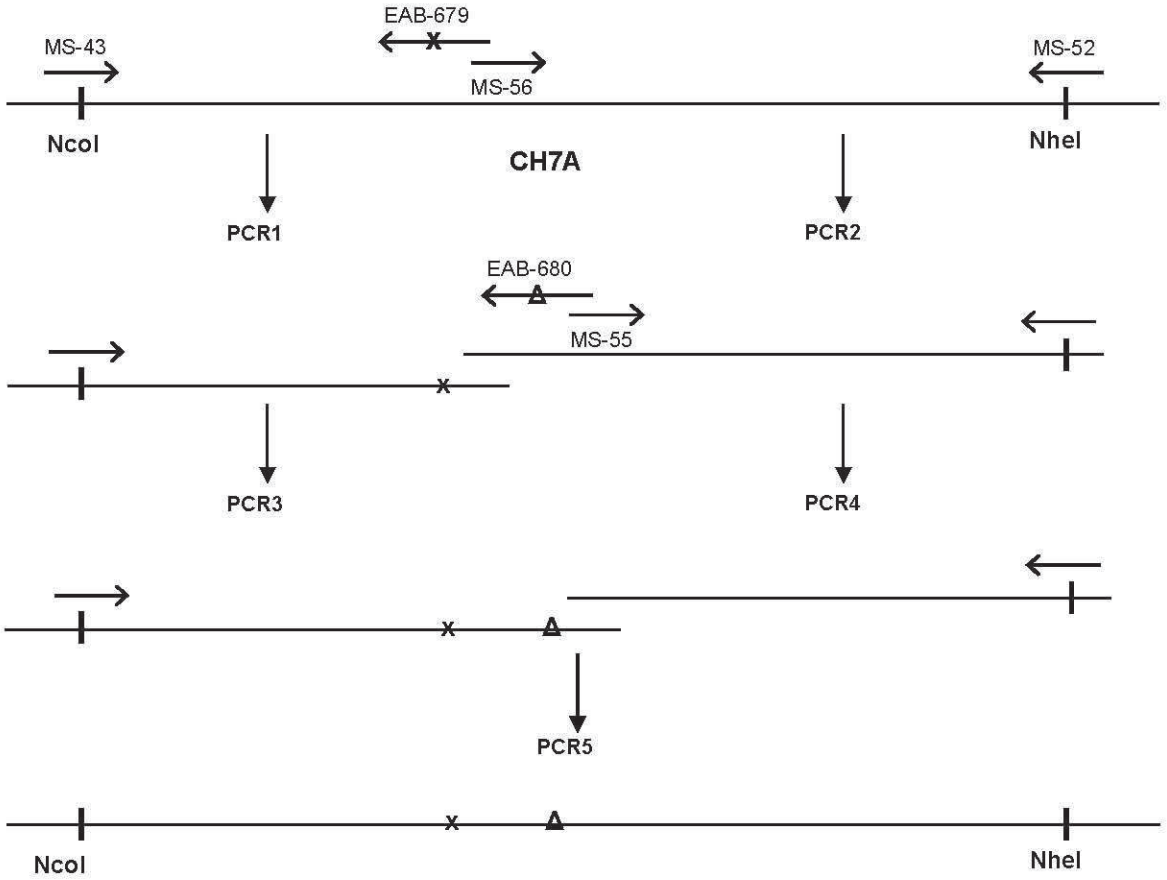


Fig. 11

aleatorización de CDR1 y CDR2 VL(CL1A)

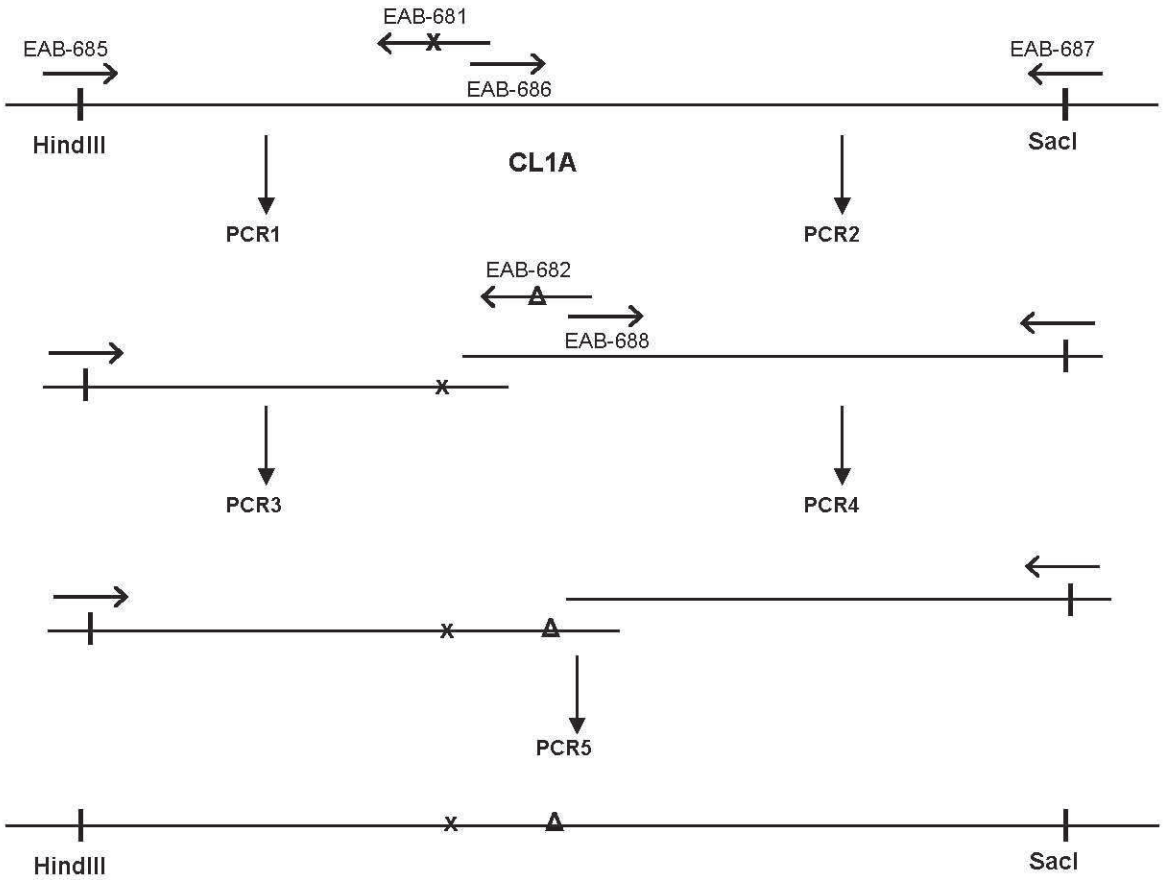


Fig. 12

aleatorización de CDR3 VH (CH7A)

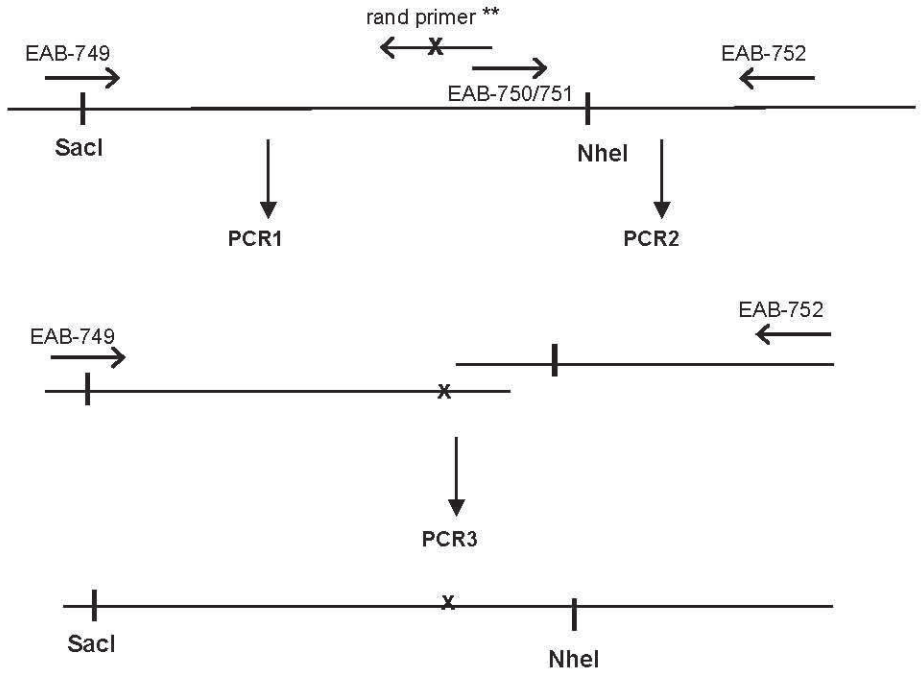


Fig. 13

aleatorización de CDR3 VL (CL1A)

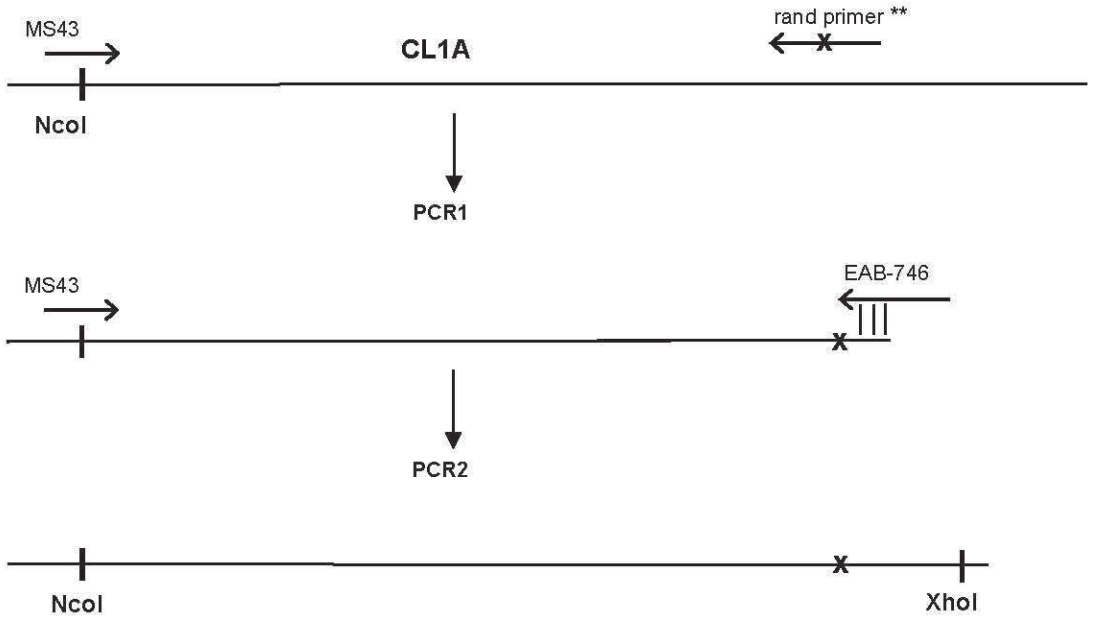
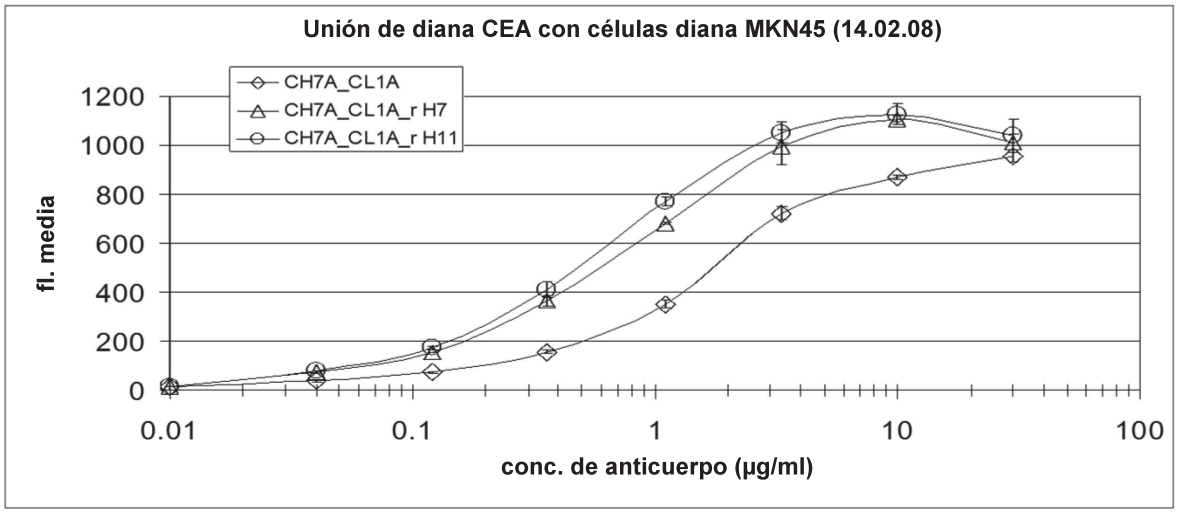


Fig. 14


Unión de diana CEA con células diana MKN45 (14.02.08)
CH7A_CL1A
CH7A_CL1A_r H7
CH7A_CL1A_r H11
fl. media
1200
1000
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
conc. de anticuerpo (µg/ml)

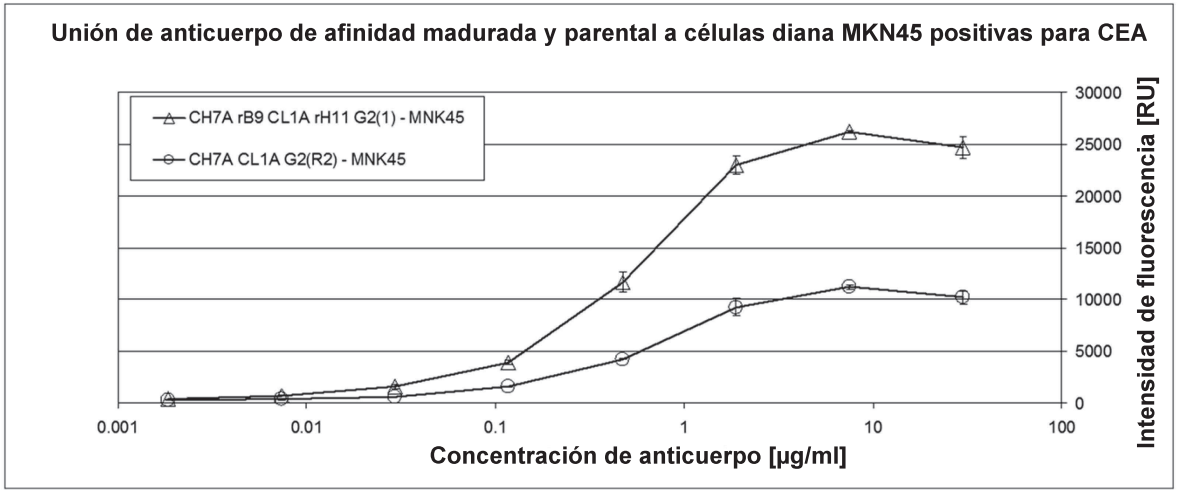

Unión de anticuerpo de afinidad madurada y parental a células diana MKN45 positivas para CEA
CH7A rB9 CL1A rH11 G2(1) - MNK45
CH7A CL1A G2(R2) - MNK45
Intensidad de fluorescencia [RU]
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentración de anticuerpo [µg/ml]

Fig. 15

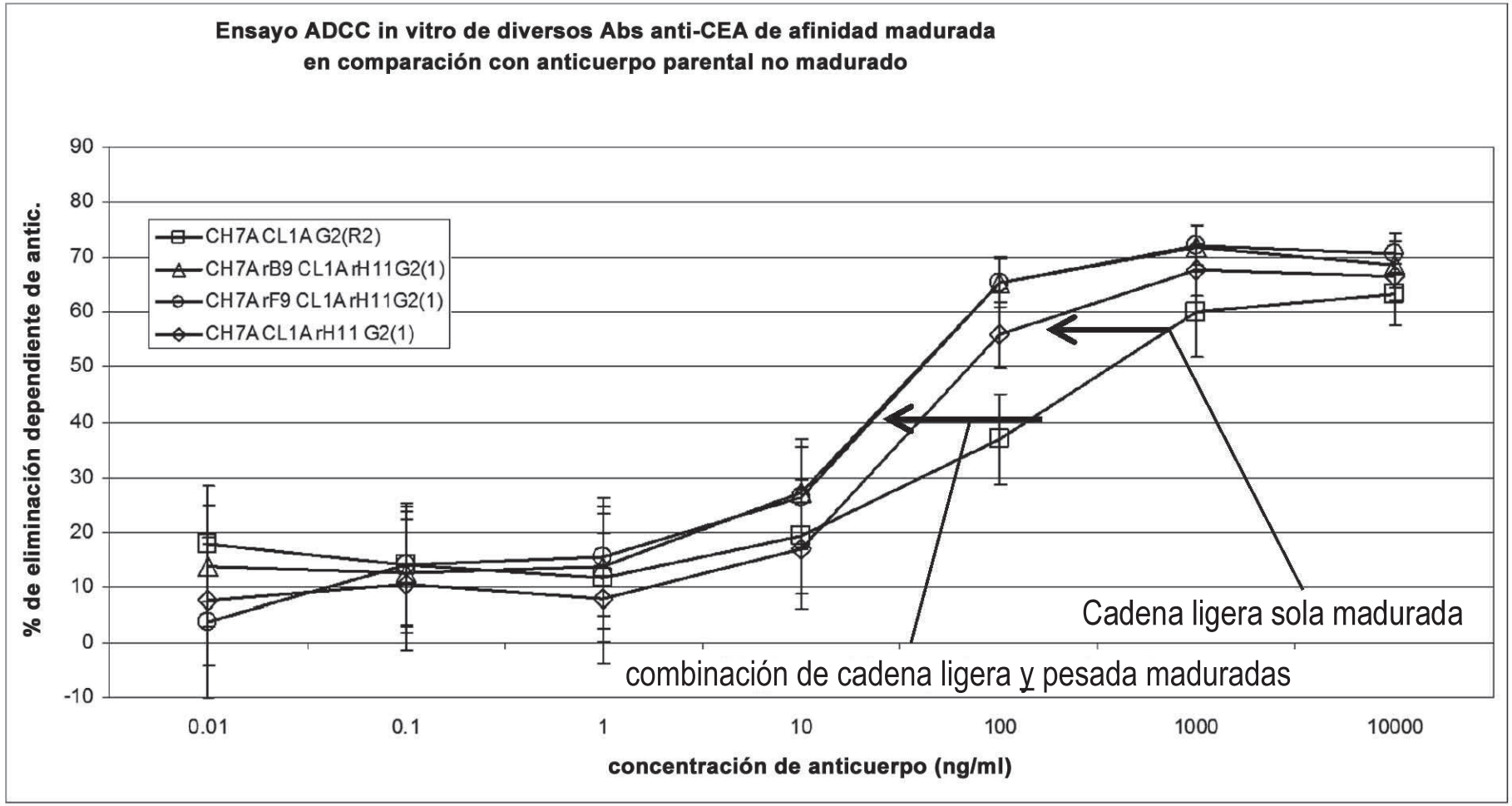

Ensayo ADCC in vitro de diversos Abs anti-CEA de afinidad madurada
en comparación con anticuerpo parental no madurado
% de eliminación dependiente de antic.
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
CH7ACL1AG2(R2)
CH7ArB9 CL1ArH11G2(1)
CH7ArF9 CL1ArH11G2(1)
CH7ACL1ArH11 G2(1)
Cadena ligera sola madurada
combinación de cadena ligera y pesada maduradas
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentración de anticuerpo (ng/ml)

Fig. 16

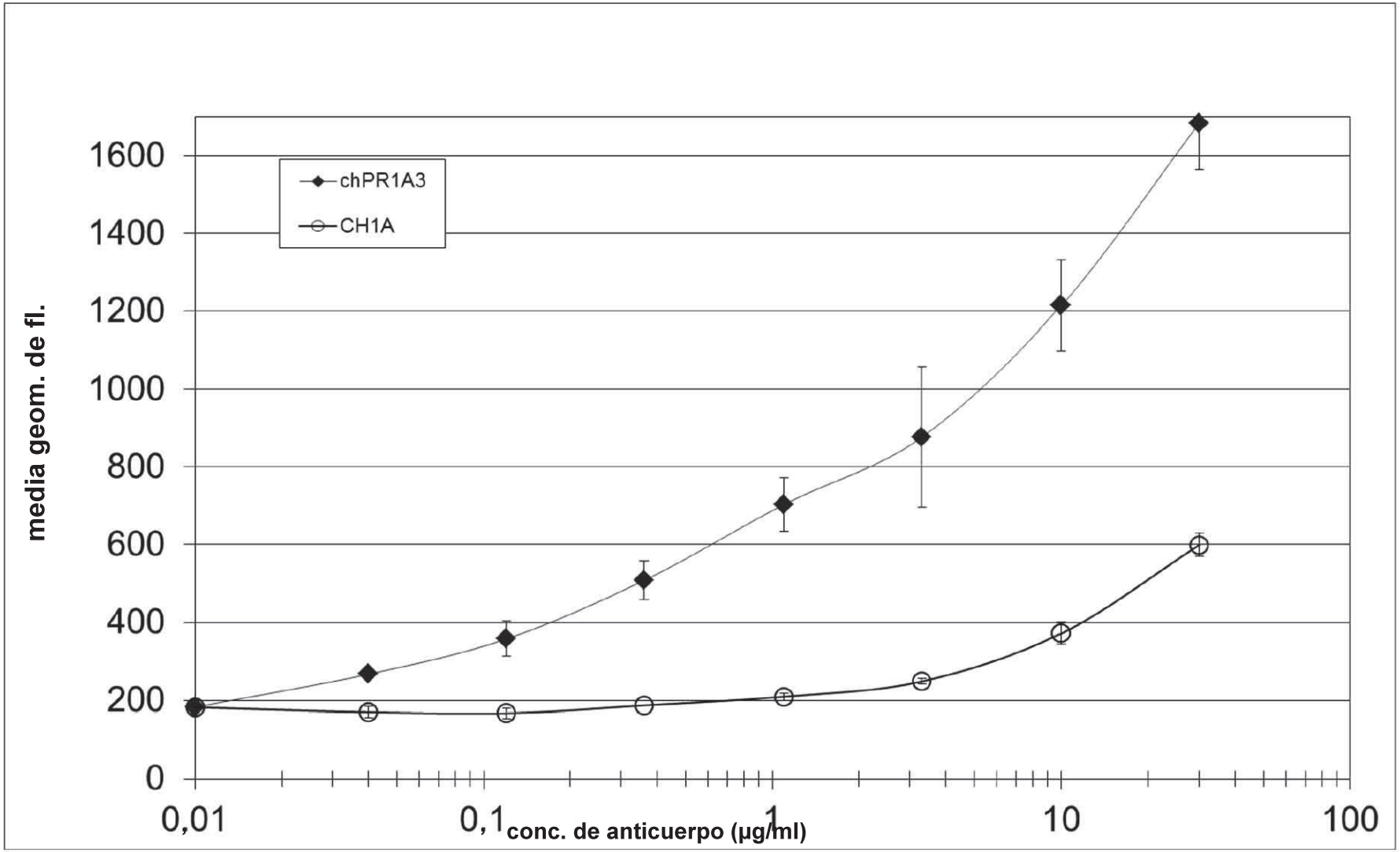

media geom. de fl.
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
chPR1A3
CH1A
0,01
0,1
1
10
100
conc. de anticuerpo (µg/ml)

Fig. 17

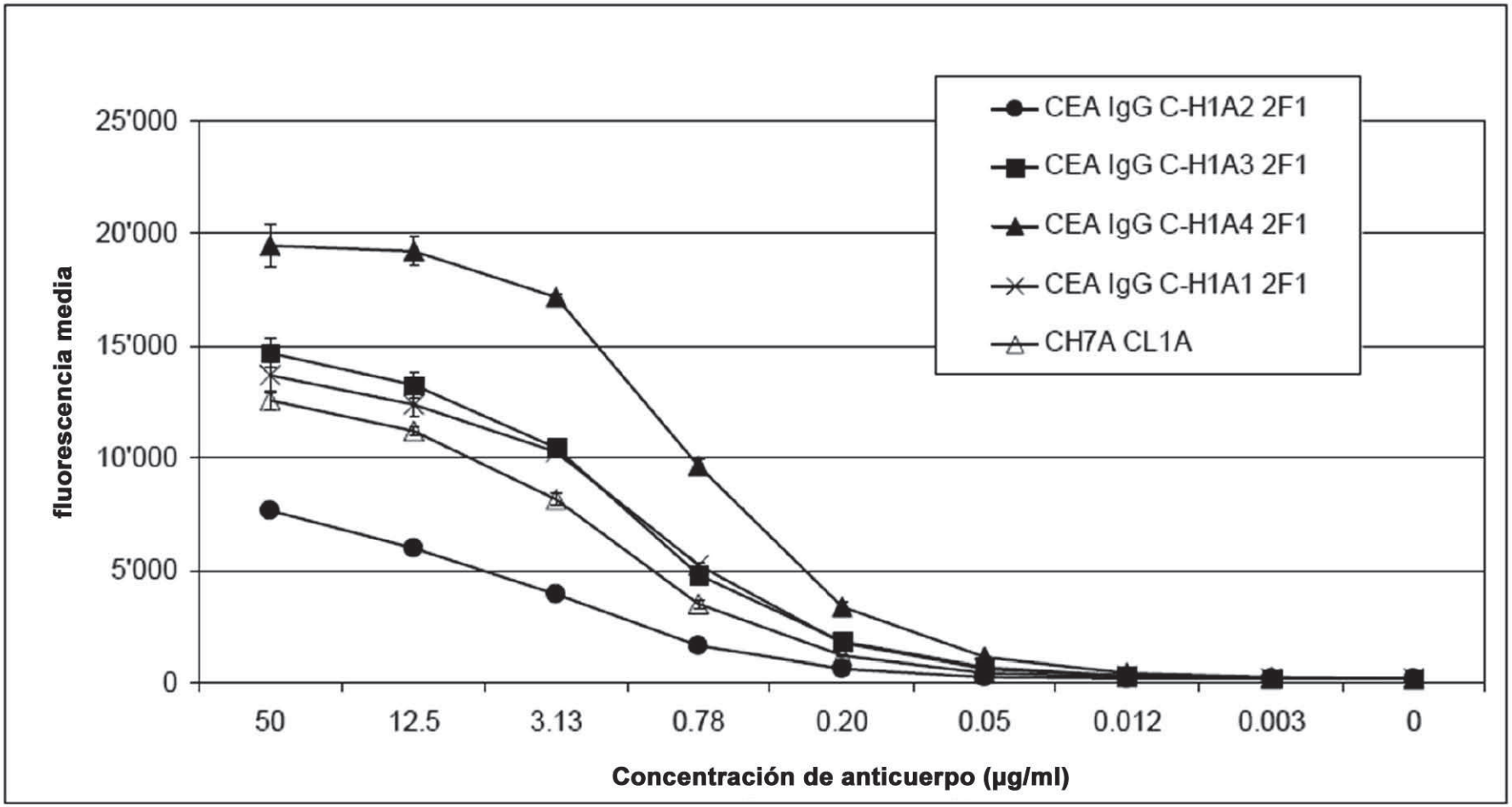

25'000
20'000
15'000
10'000
5'000
0
fluorescencia media
50
12.5
3.13
0.78
0.20
0.05
0.012
0.003
0
Concentración de anticuerpo (µg/ml)
CEA IgG C-H1A2 2F1
CEA IgG C-H1A3 2F1
CEA IgG C-H1A4 2F1
CEA IgG C-H1A1 2F1
CH7A CL1A

Fig. 18

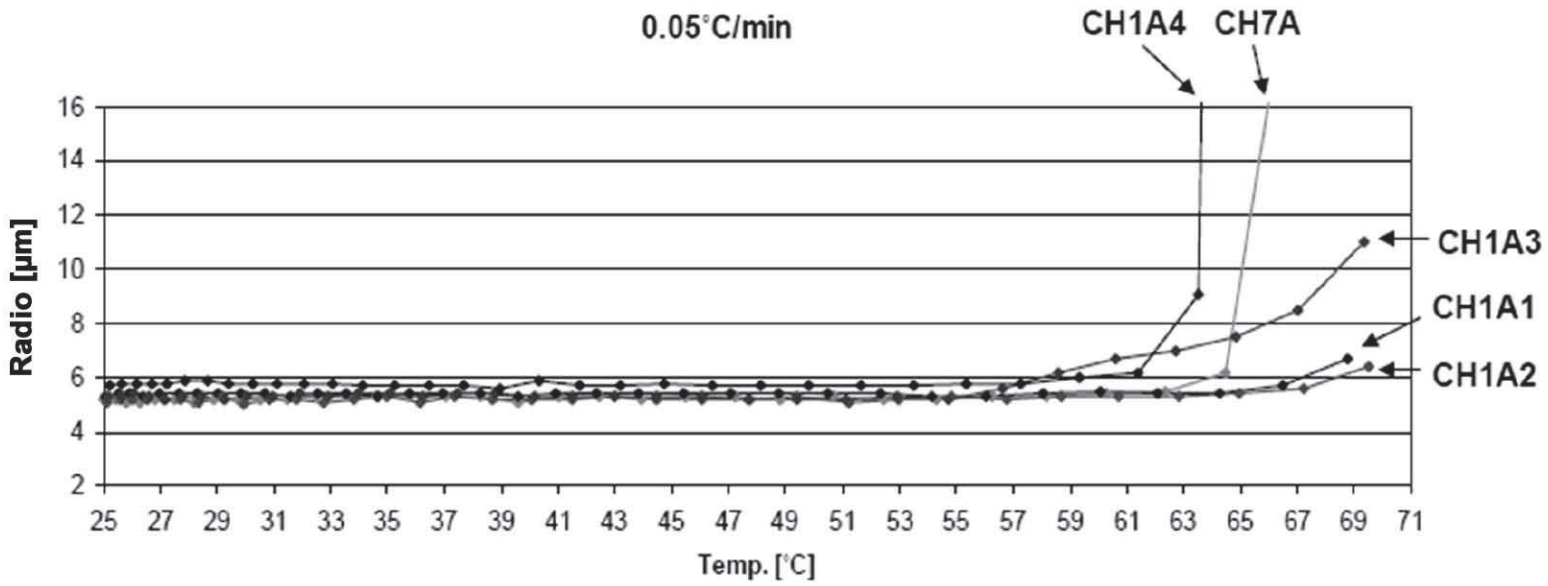
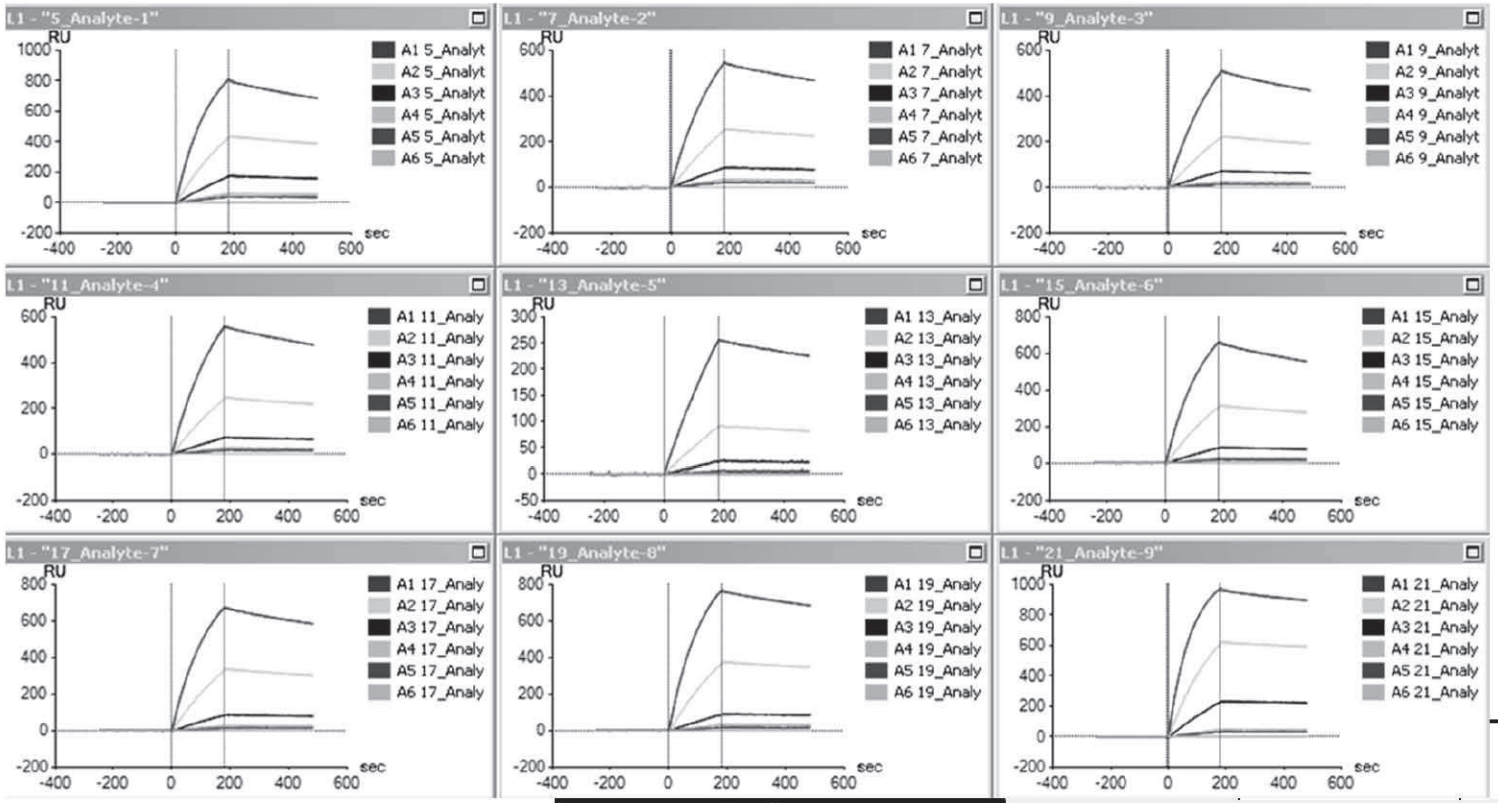

0.05°C/min
CH1A4
CH7A
CH1A3
CH1A1
CH1A2
Radio [µm]
16
14
12
10
8
6
4
2
25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71
Temp. [°C]

Fig. 19



Constructo	ID de ensayo	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH1A1D	11 Analito 4	$5.31x10^{4}$	$4.93x10^{-4}$	$9.28x10^{-9}$
CH1A1E	13 Analito 5	$2.11x10^{4}$	$4.23x10^{-4}$	$2.00x10^{-8}$
CH1A1F	15 Analito 6	$7.08x10^{4}$	$5.36x10^{-4}$	$7.58x10^{-9}$
CH1A1G	17 Analito 7	$7.30x10^{4}$	$4.45x10^{-4}$	$6.10x10^{-9}$
CH1A1	19 Analito 8	$8.19x10^{4}$	$3.47x10^{-4}$	$4.24x10^{-9}$
CH7A	21 Analito 9	$1.22x10^{5}$	$2.24x10^{-4}$	$1.84x10^{-9}$
CH1A1A	5 Analito 1	$8.18x10^{4}$	$4.83x10^{-4}$	$5.91x10^{-9}$
CH1A1B	7 Analito 2	$5.37x10^{4}$	$4.78x10^{-4}$	$8.90x10^{-9}$
CH1A1C	9 Analito 3	$4.49x10^{4}$	$5.84x10^{-4}$	$1.30x10^{-8}$

Fig. 20

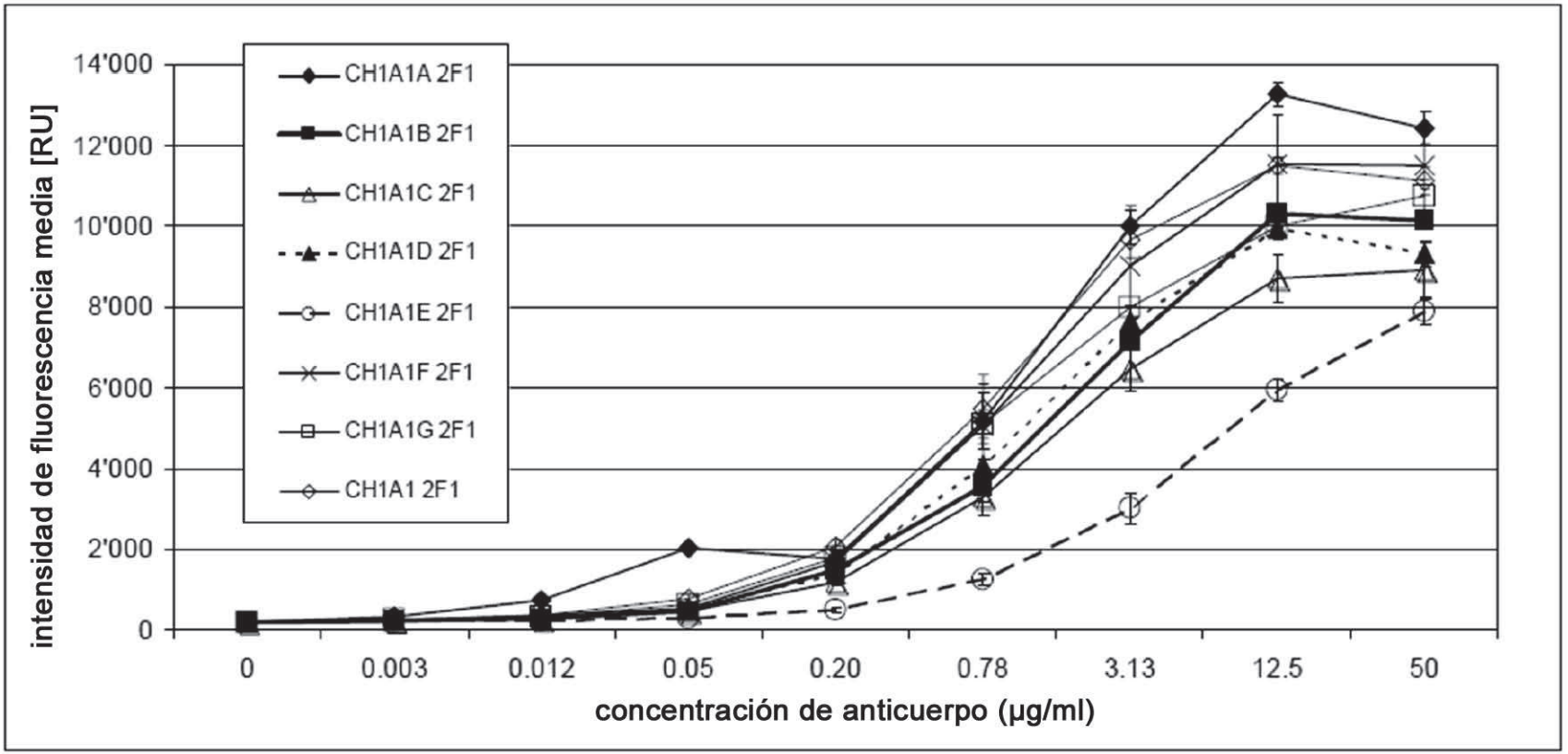
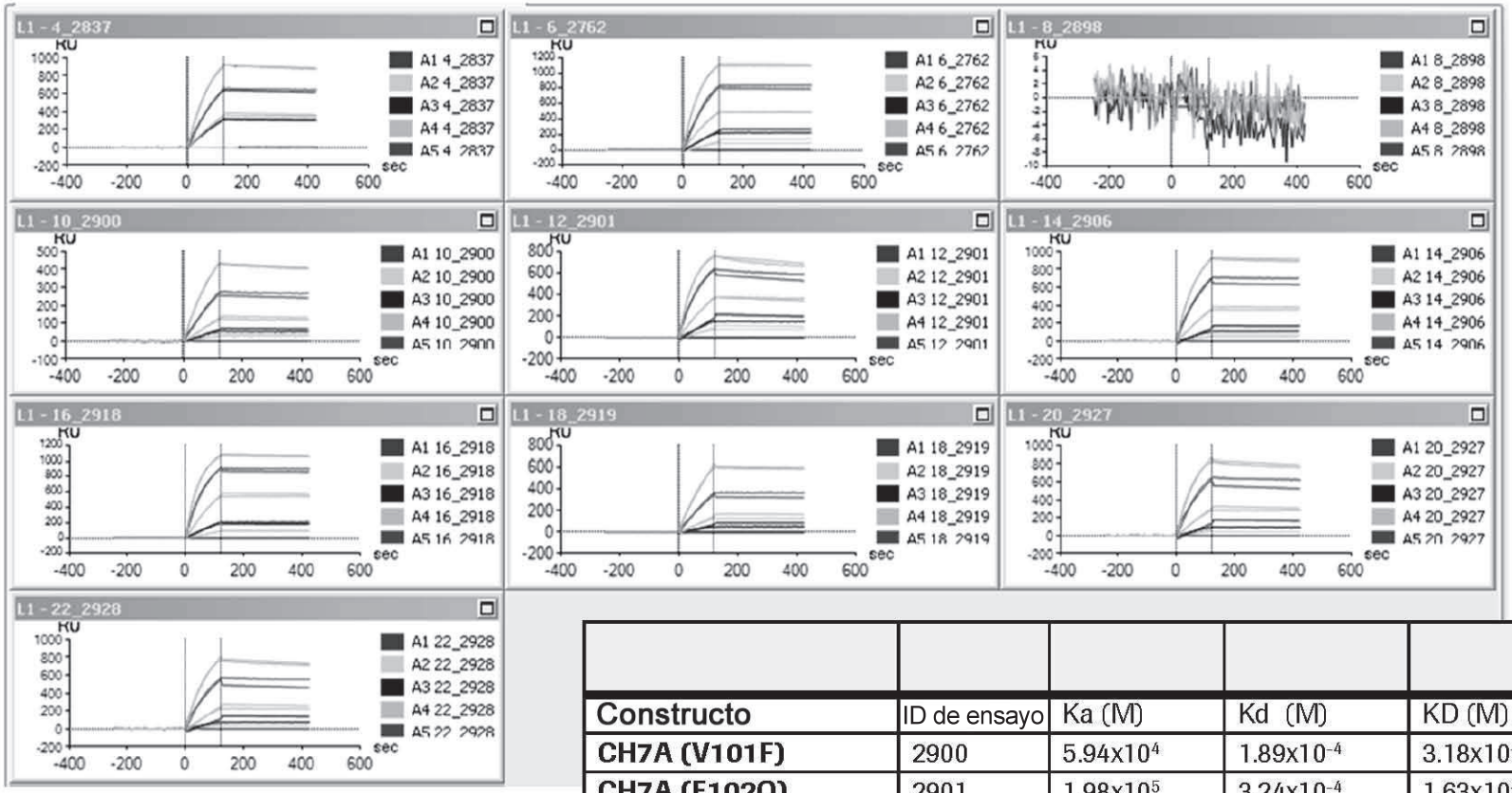

intensidad de fluorescencia media [RU]
14'000
12'000
10'000
8'000
6'000
4'000
2'000
0
CH1A1A 2F1
CH1A1B 2F1
CH1A1C 2F1
CH1A1D 2F1
CH1A1E 2F1
CH1A1F 2F1
CH1A1G 2F1
CH1A1 2F1
0
0.003
0.012
0.05
0.20
0.78
3.13
12.5
50
concentración de anticuerpo (µg/ml)

Fig. 21



Constructo	ID de ensayo	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH7A (V101F)	2900	$5.94x10^{4}$	$1.89x10^{-4}$	$3.18x10^{-9}$
CH7A (E102Q)	2901	$1.98x10^{5}$	$3.24x10^{-4}$	$1.63x10^{-9}$
CH7A (Y98A)	2906	$1.32x10^{5}$	$6.86x10^{-5}$	$5.20x10^{-10}$
CH7A (Y98A/D99Y)	2918	$2.36x10^{5}$	$4.40x10^{-5}$	$1.86x10^{-10}$
CH7A (A103T)	2919	$2.51x10^{4}$	$7.20x10^{-5}$	$2.87x10^{-9}$
CH7A (D99Y)	2927	$1.14x10^{5}$	$1.97x10^{-4}$	$1.73x10^{-9}$
CH7A (D99H)	2928	$8.65x10^{4}$	$1.95x10^{-4}$	$2.25x10^{-9}$
CH7A CL1A 2F1	2837	$1.32x10^{5}$	$1.41x10^{-4}$	$1.07x10^{-9}$
5HFF12 2F1	2762	$1.52x10^{5}$	$1.94x10^{-5}$	$1.28x10^{-10}$
CH7A (W95Y)	2898	$5.61x10^{-4}$	109.73	$1.95\ x10^{5}$

Fig. 22

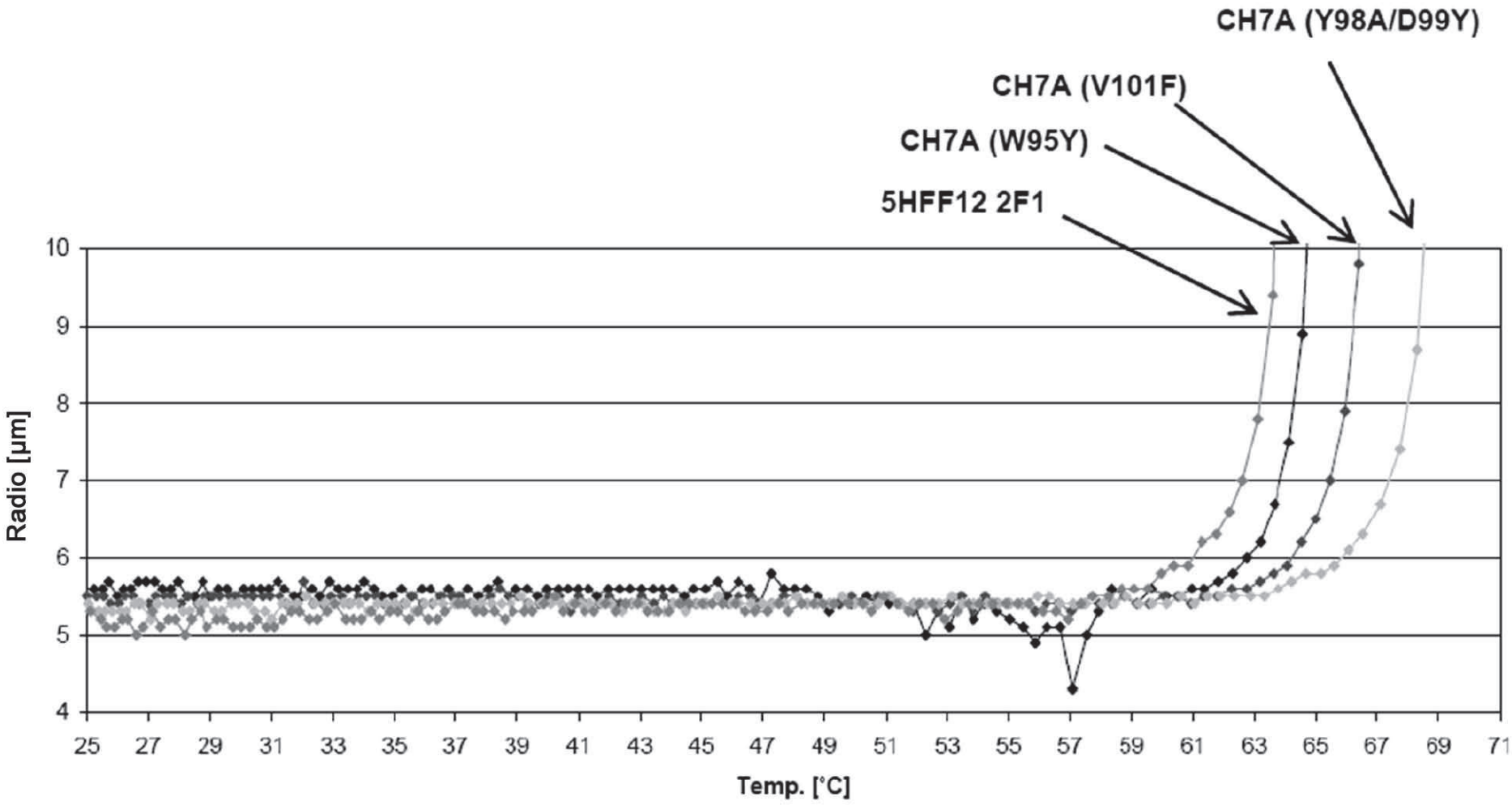

CH7A (Y98A/D99Y)
CH7A (V101F)
CH7A (W95Y)
5HFF12 2F1
Radio [µm]
10
9
8
7
6
5
4
25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71
Temp. [°C]

Fig. 23

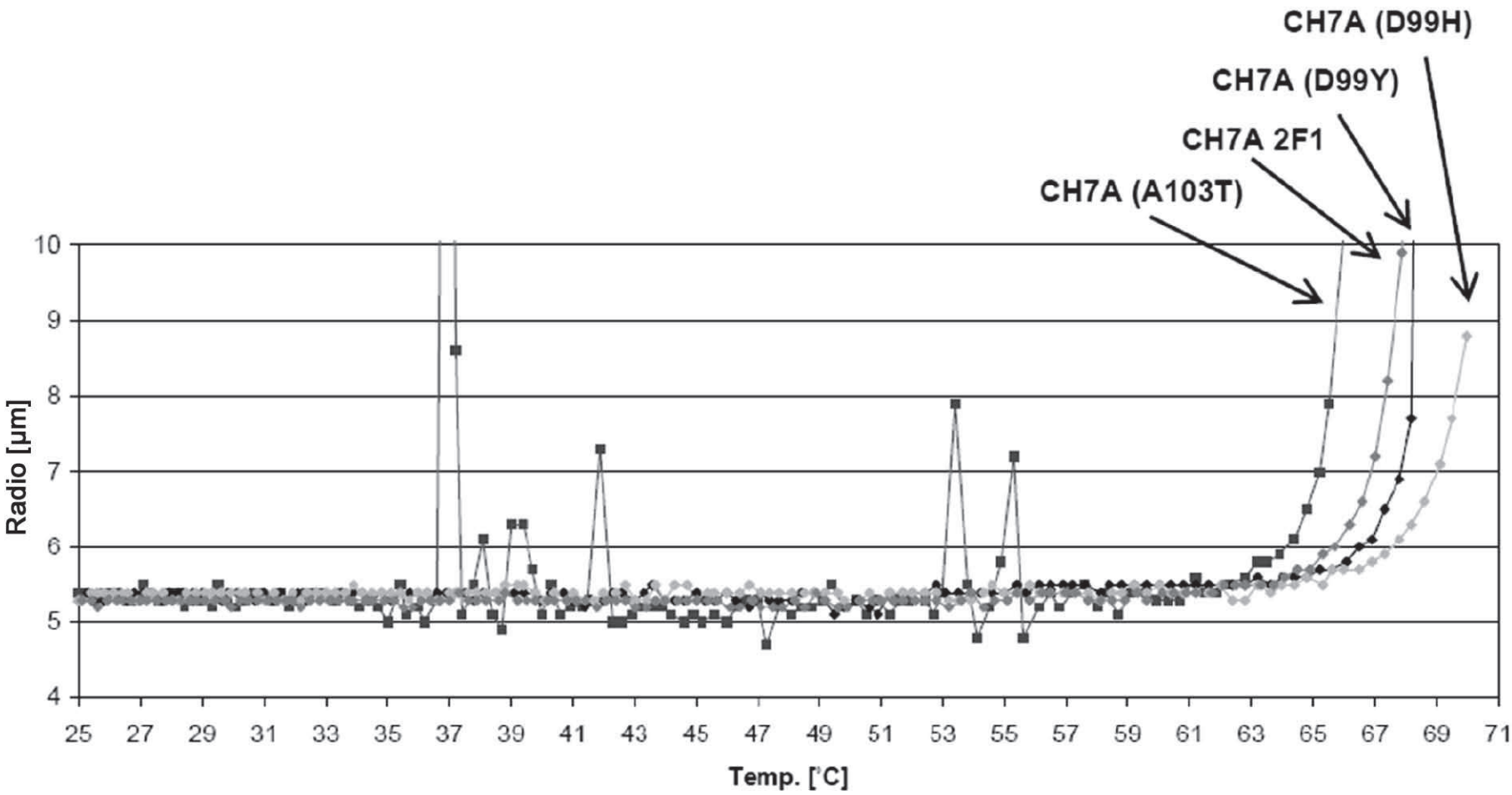

CH7A (D99H)
CH7A (D99Y)
CH7A 2F1
CH7A (A103T)
Radio [µm]
10
9
8
7
6
5
4
25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71
Temp. [°C]

Fig. 24

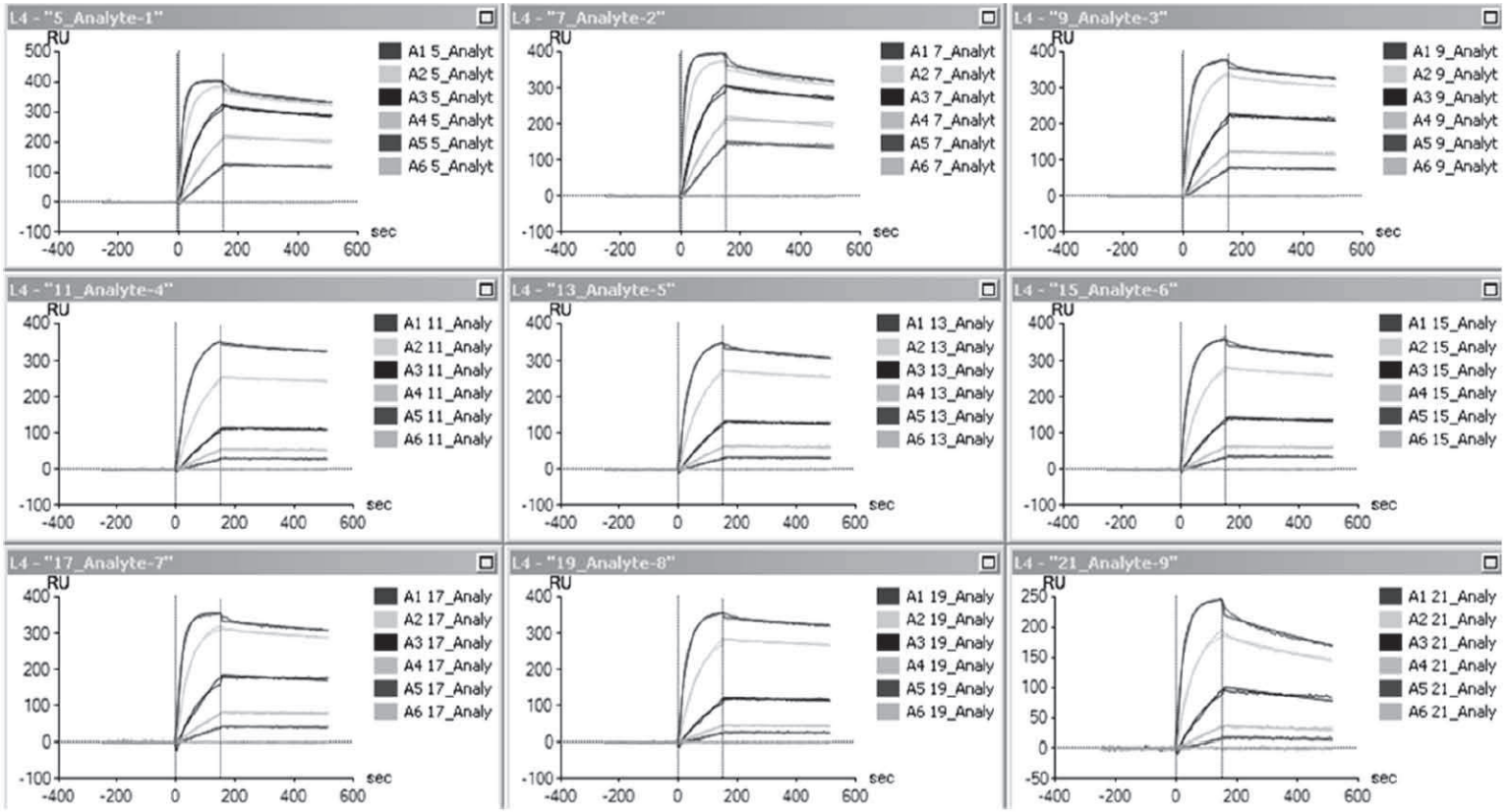


Fig. 25

Constructo	ID de ensayo	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH1B 5L1A10 2F1	11 Analito 4	$2.21x10^{5}$	$1.54x10^{-4}$	$6.98x10^{-10}$
CH1A1A 5L1A10 2F1	13 Analito 5	$2.80x10^{5}$	$2.18x10^{-4}$	$7.80x10^{-10}$
CH1A1B 5L1A10 2F1	15 Analito 6	$3.30x10^{5}$	$2.47x10^{-4}$	$7.47x10^{-10}$
CH7A (Y98A/D99Y) 2F1	17 Analito 7	$4.81x10^{5}$	$2.24x10^{-4}$	$4.65x10^{-10}$
5L1A10 2F1	19 Analito 8	$3.36x10^{5}$	$1.78x10^{-4}$	$5.29x10^{-10}$
CH7A 2F1	21 Analito 9	$3.69x10^{5}$	$7.27x10^{-4}$	$1.97x10^{-9}$
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1	5 Analito 1	$6.28x10^{5}$	$3.37x10^{-4}$	$5.37x10^{-10}$
CH1A1B (Y98A/D99Y) 2F1	7 Analito 2	$7.11x10^{5}$	$3.61x10^{-4}$	$5.07x10^{-10}$
CH1B (Y98A/D99Y) 2F1	9 Analito 3	$4.19x10^{5}$	$2.45x10^{-4}$	$5.85x10^{-10}$

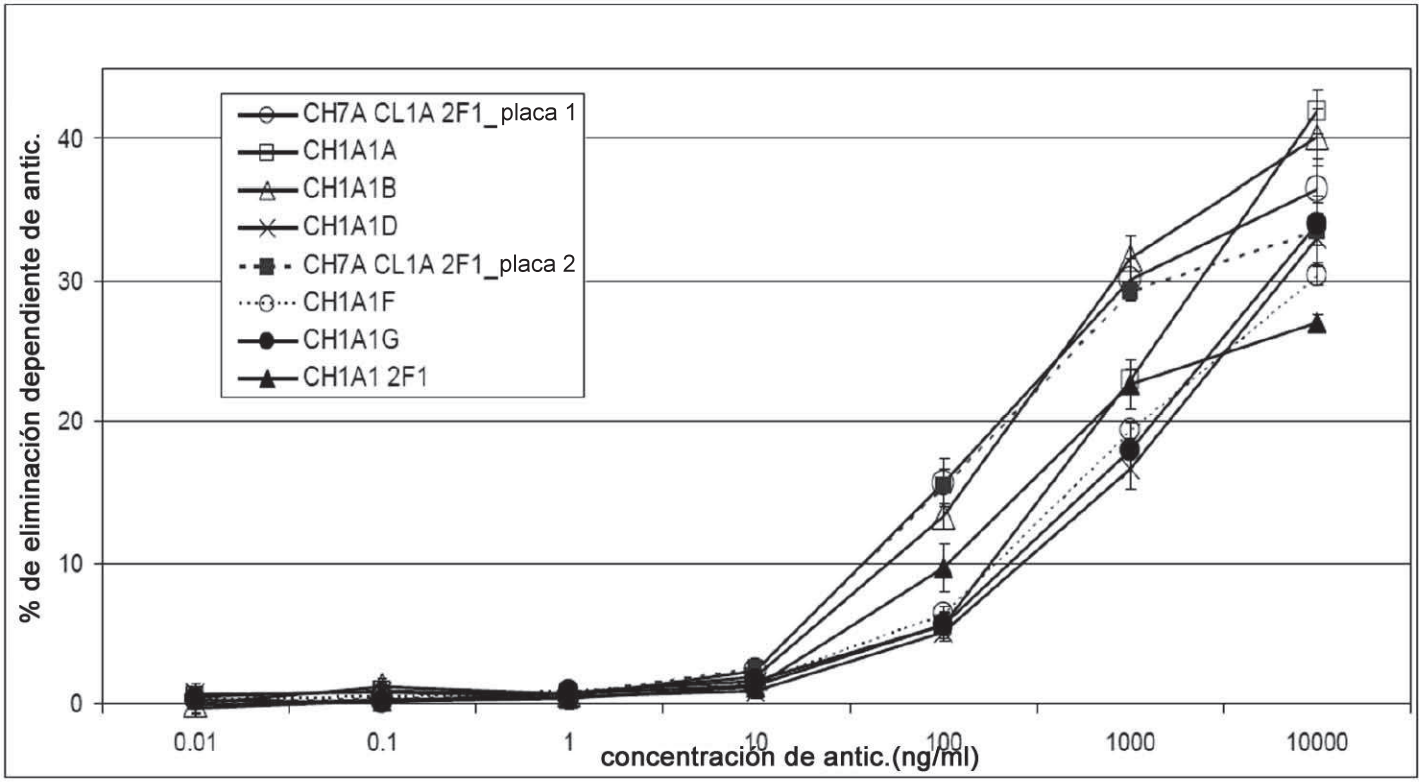

CH7A CL1A 2F1_placa 1
CH1A1A
CH1A1B
CH1A1D
CH7A CL1A 2F1_placa 2
CH1A1F
CH1A1G
CH1A1 2F1
% de eliminación dependiente de antic.
0
10
20
30
40
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentración de antic.(ng/ml)

Fig. 26

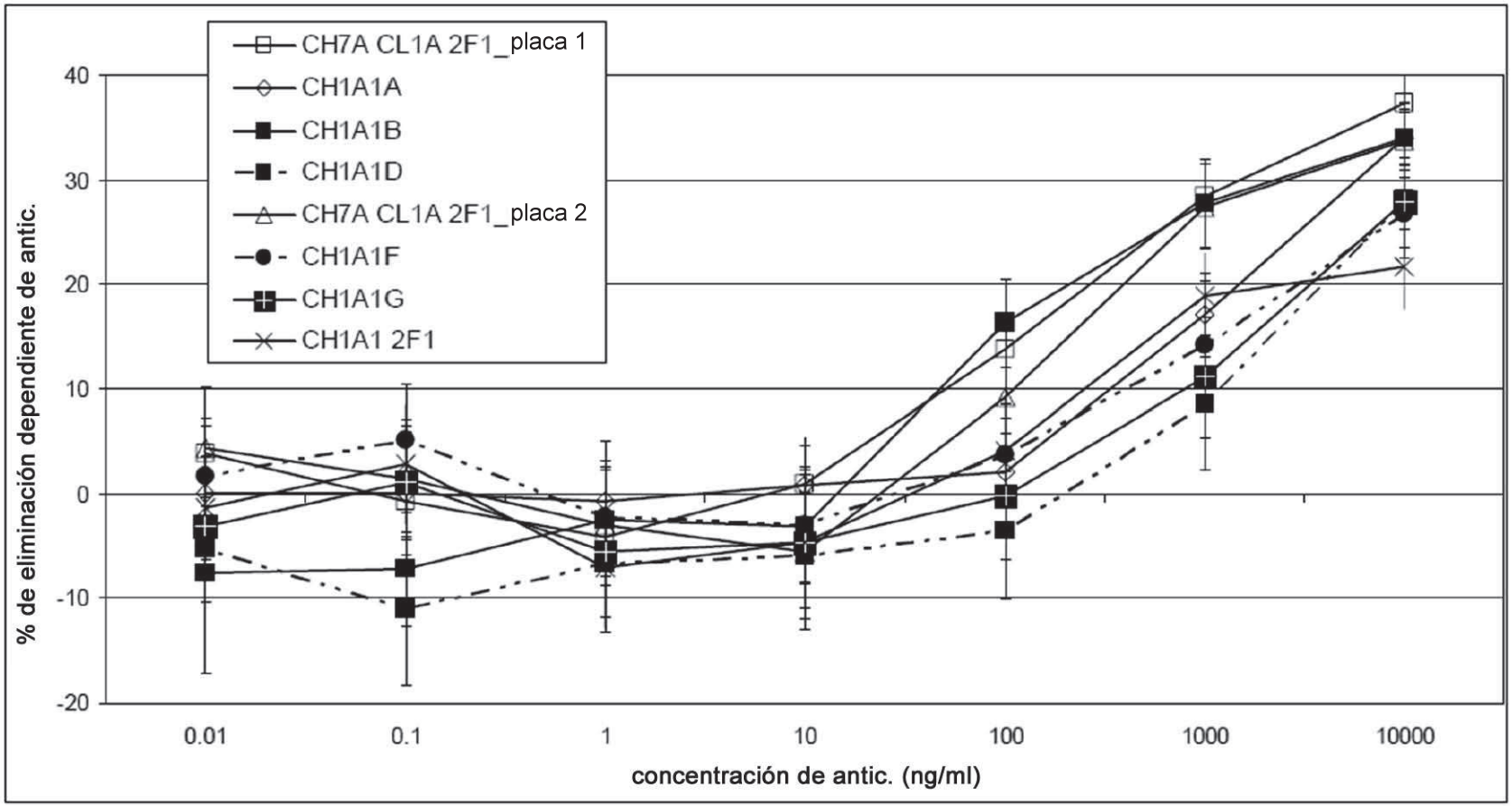

CH7A CL1A 2F1_placa 1
CH1A1A
CH1A1B
CH1A1D
CH7A CL1A 2F1_placa 2
CH1A1F
CH1A1G
CH1A1 2F1
40
30
20
10
0
-10
-20
% de eliminación dependiente de antic.
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentración de antic. (ng/ml)

Fig. 27

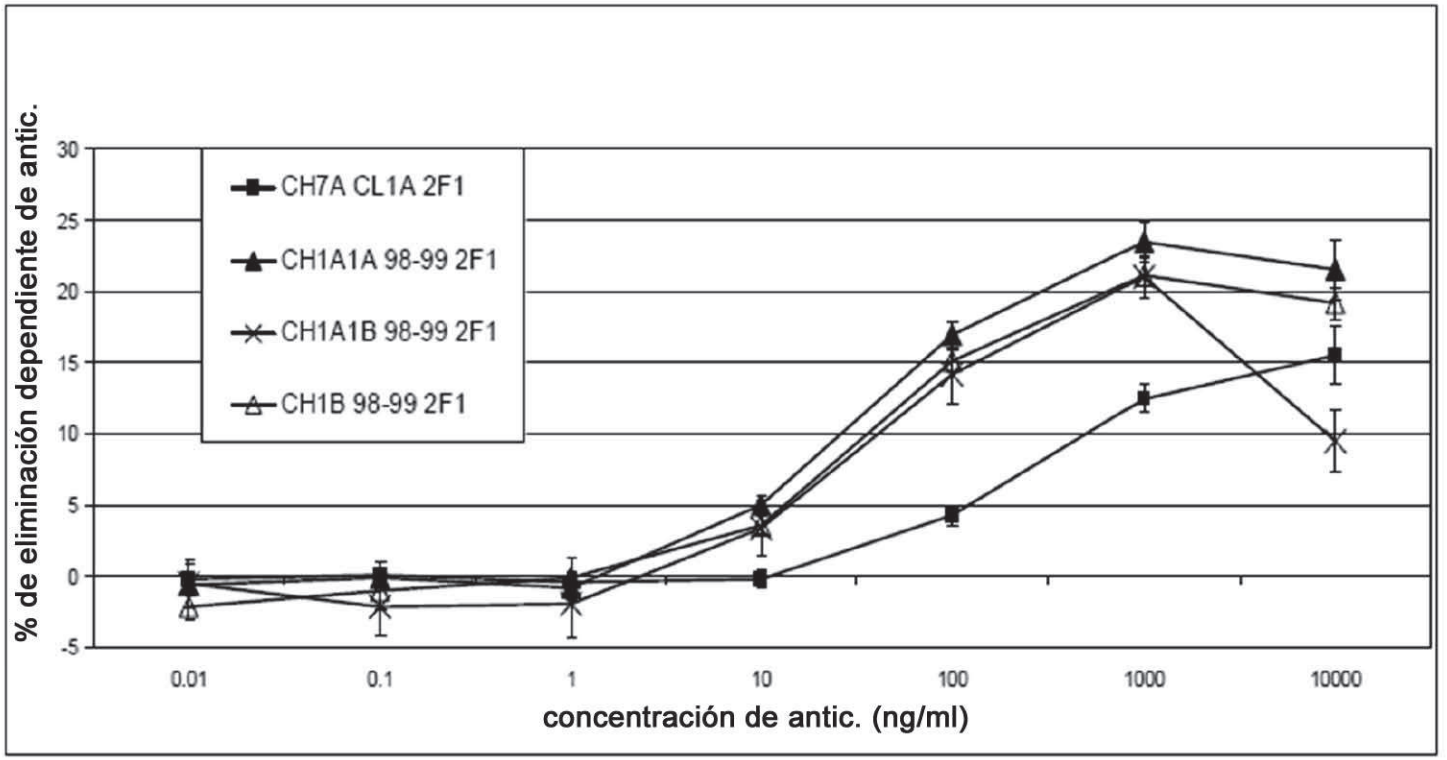

% de eliminación dependiente de antic.
30
25
20
15
10
5
0
-5
CH7A CL1A 2F1
CH1A1A 98-99 2F1
CH1A1B 98-99 2F1
CH1B 98-99 2F1
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentración de antic. (ng/ml)

Fig. 28

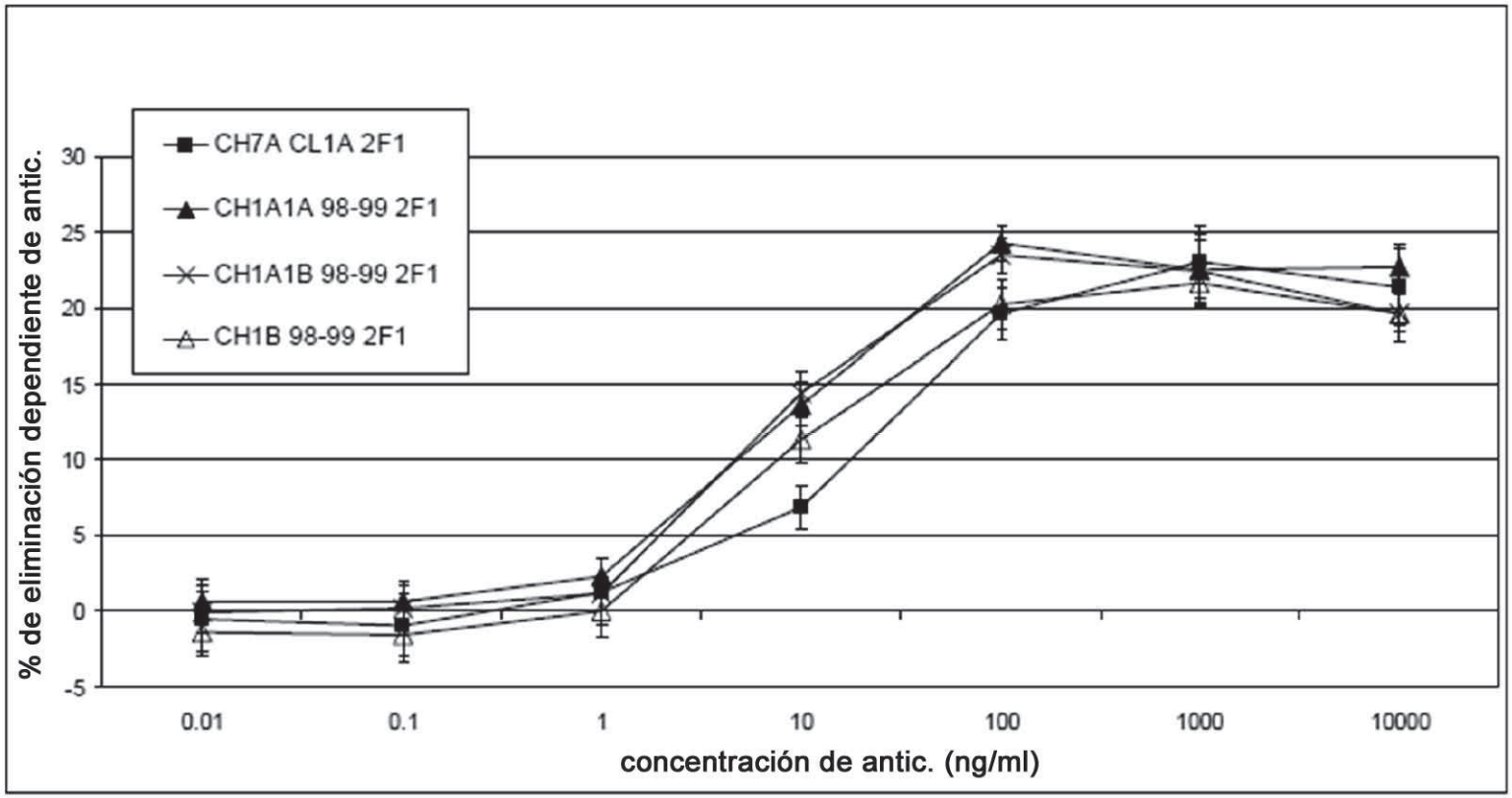

CH7A CL1A 2F1
CH1A1A 98-99 2F1
CH1A1B 98-99 2F1
CH1B 98-99 2F1
% de eliminación dependiente de antic.
30
25
20
15
10
5
0
-5
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentración de antic. (ng/ml)

Fig. 29

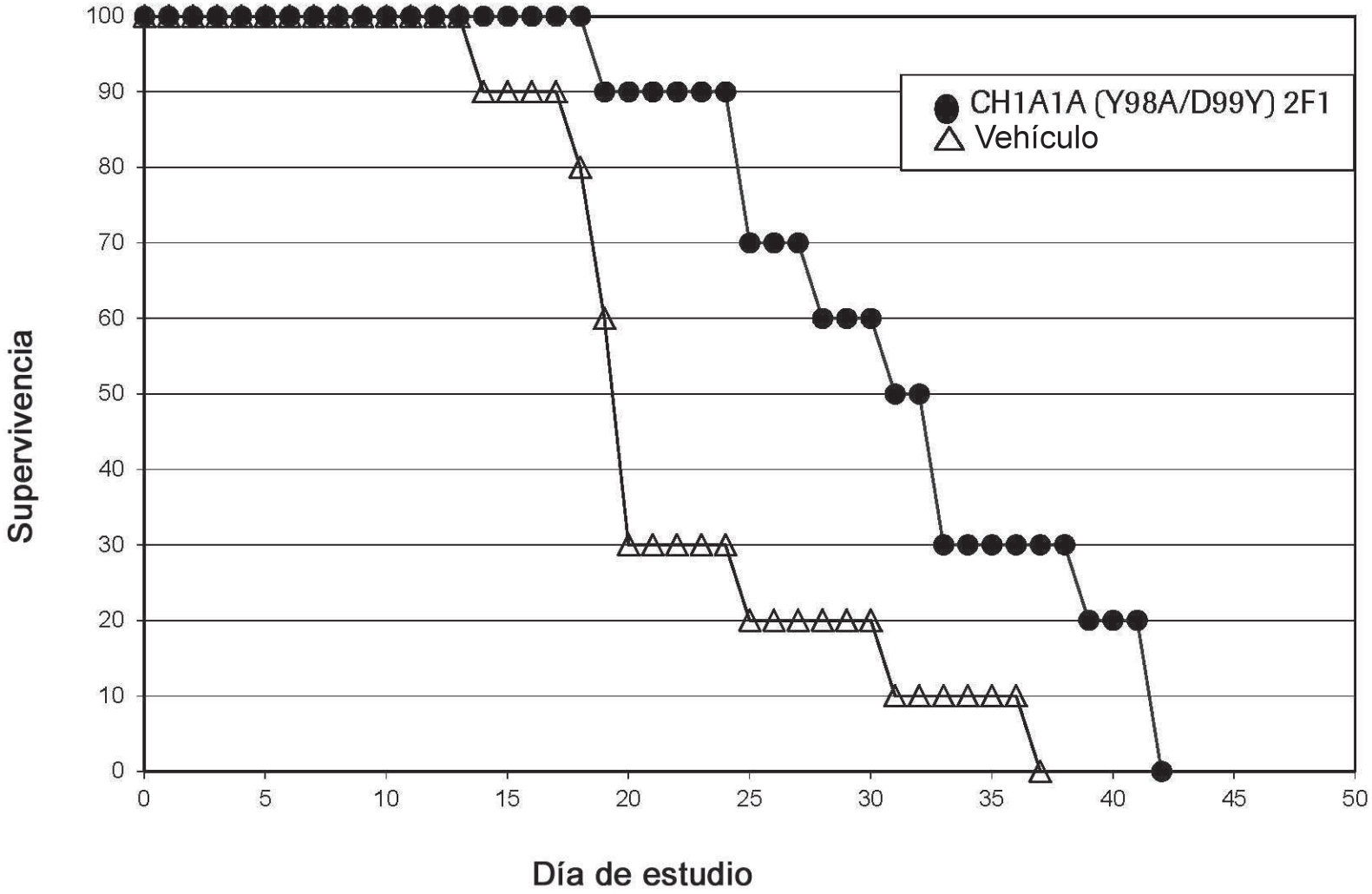

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Supervivencia
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Día de estudio
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1
Vehículo

Fig. 30

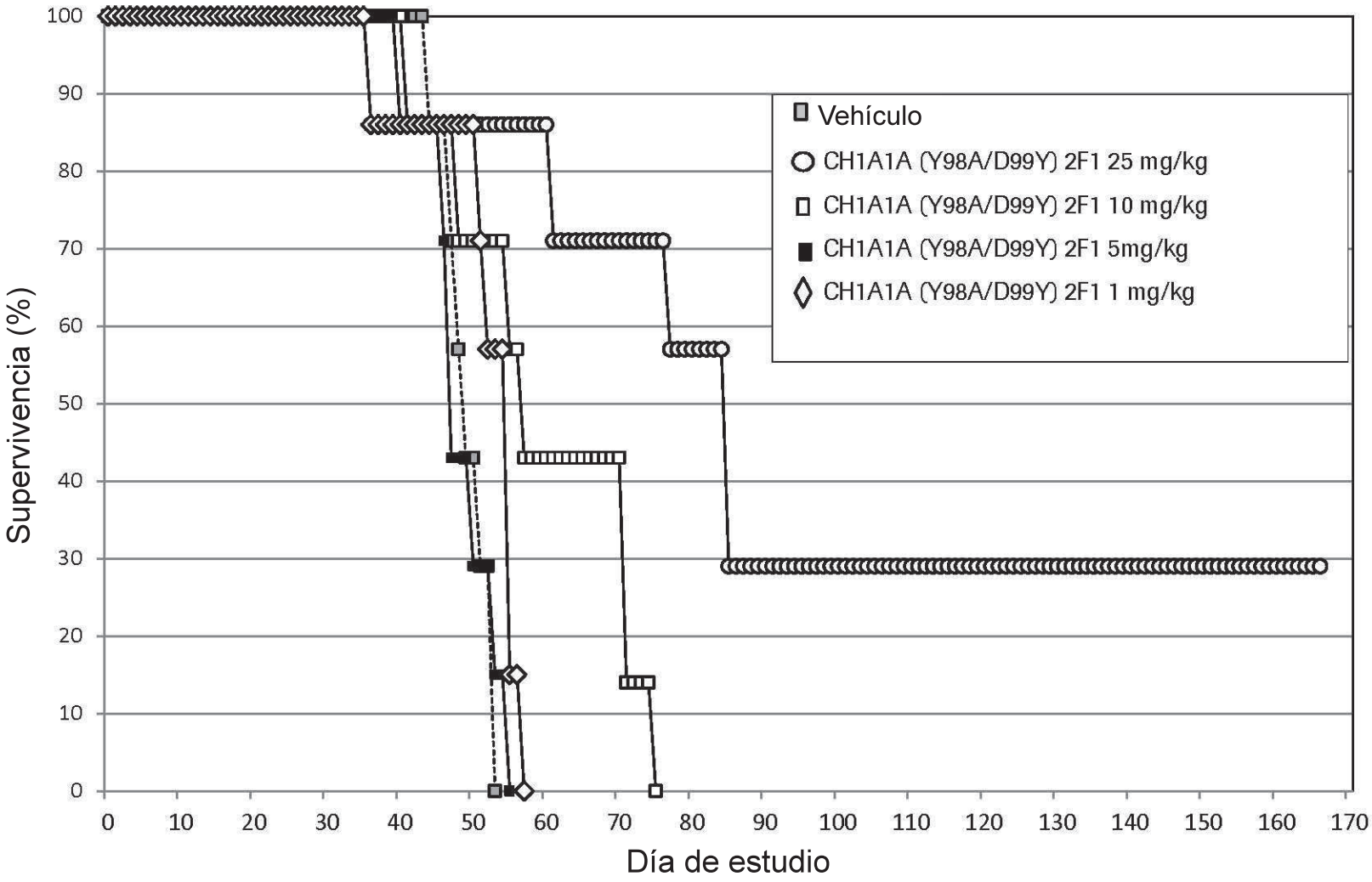

Supervivencia (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
Día de estudio
Vehículo
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1 25 mg/kg
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1 10 mg/kg
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1 5mg/kg
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1 1 mg/kg

Fig. 31

CDR		Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR1 de cadena pesada	Kabat	EFGMN	1
		E**Y**GMN	2
		E**YS**MN	3
		EFGM**S**	5
	Chothia	GYTFTEF	6
		GYTFTE**Y**	7
	AbM	GYTFTEFGMN	8
		GYTFTE**Y**GMN	9
		GYTFTE**YS**MN	10
		GYTFTEFGM**S**	12
CDR2 de cadena pesada	Kabat	WINTKTGEATYVEEFKG	13
		WINTKTGEATY**I**EEFKG	14
		WINTK**S**GEATYVEEFKG	15
		YINTK**N**GEA**N**YVEEFKG	16
		WINTK**N**GEATY**I**EEFKG	17
	Chothia	NTKTGEAT	18
		NTK**S**GEAT	19
		NTK**N**GEA**N**	20
	AbM	WINTKTGEAT	21
		WINTK**S**GEAT	22
		YINTK**N**GEA**N**	23
		WINTK**N**GEAT	24
CDR3 de cadena pesada	Kabat Chothia and AbM	WDFYDYVEAMDY	25
		WDFY**H**YVEAMDY	26
		WDF**V**DYVEAMDY	27
		WDFY**W**YVEAMDY	28
		WD**AFE**YV**K**A**L**DY	29
		WDF**FE**Y**FKT**MDY	30
		WDF**FY**YV**QT**MDY	31
		WDF**SY**YVEAMDY	32
		WDF**AH**Y**FQT**MDY	33
		WDF**AY**Y**FQT**MDY	34
		WDF**AY**Y**L**EAMDY	35

CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
CDR1 de cadena ligera	KASQNVGTNVA	36
	KAS**A**NVG**N**NVA	37
	KAS**K**NVGTNVA	38
	KAS**AA**VGT**Y**VA	39
	KASQ**YAS**TNVA	40
	KAS**H**NVGTNVA	41
	KASQ**IM**G**P**NVA	42
	KASQ**I**VGTNVA	43
	KASQ**K**V**L**TNVA	44
	KASQ**T**V**SA**NVA	45
CDR2 de cadena ligera	SASYRYS	46
	Y**L**ASNLSG	47
	Y**L**ASY**PQI**	48
	YSASYR**KR**	49
	Y**W**ASYRYS	50
	YSAS**H**RYS	51
	YLASY**HE**S	52
	YSAS**H**R**P**S	53
	Y**L**ASYRYS	54
	Y**L**ASYRY**R**	55
CDR3 de cadena ligera	HQYYTYPLFT	56

Fig. 32

SEC ID nº	CONSTRUCTO DE CADENA LIGERA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
207	pAC21 (3A1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASANVGNNVAWYQQKPGKAPKLLIYLASNRSGGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
208	pAC19 (2C6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASKNVGTNVAWYQQKPGKAPKPLIYLASYPQIGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
209	pAC18 (2F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
210	pAC23 (2F11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIASTNVAWYQQKPGKAPKLLIYWASYRYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
211	H4E9 cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKPLIYSASYRYSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
212	L2D2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASHNVGTNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRYSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
213	pAC6 (C1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIMGPNVAWYQQKPGKAPKLLIYLASYHESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
214	pAC7 (E10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIVGTNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASHRPSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
215	pAC12 (H7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQKVLTNVAWYQQKPGKAPKLLIYLASYRYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
216	pAC13 (H11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQTVSANVAWYQQKPGKAPKLLIYLASYRYRGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT

Fig. 33

SEC ID nº	CDR-H3 (los residuos aleatorizados se encuentran subrayados; los residuos seleccionados, en negrita)	Afinidad (determinada mediante Biacore)	Constructo
25	W D F Y D Y V E A M D Y	3681 nM	PMS22
26	W D F Y **H** Y V E A M D Y	586 nM	1C8
27	W D F **V** D Y V E A M D Y	1893 nM	3E1
28	W D F Y **W** Y V E A M D Y	746 nM	2D7
33	W D F **A H** Y **F Q T** M D Y	59 nM	CDRH-3 afinidad madurada
34	W D F **A Y** Y **F Q T** M D	44 nM	CDRH-3 afinidad madurada
35	W D F **A Y** Y **L** E A M D	69 nM	CDRH-3 afinidad madurada
29	W D**A F E** Y V **K** A **L** D Y	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		
1 y 13	EFGMN y WINTKTGEATYVEEFKG	3681 nM	pMS22
1 y 14	EFGMN y WINTKTGEATY**I**EEFKG	402 nM	H4E9
1 y 15	EFGMN y WINTK**S**GEATYVEEFKG		pAC14 (B9)
2 y 15	E**Y**GMN y WINTK**S**GEATYVEEFKG		pAC15 (F9)
3 y 16	E**YS**MN y **Y**INTK**N**GEA**N**YVEEFKG		H1/H2 (5) 2

Fig. 34A

SEC ID nº	CDR-H3 (los residuos aleatorizados se encuentran subrayados; los residuos seleccionados, en negrita)	Afinidad (determinada mediante Biacore)	Constructo
2 y 17	EYGMN y WINTK**N**GEATYIEEFKG		H1/H2 (5) 11
1 y 16	E**F**GMN y **Y**INTK**N**GEA**N**YVEEFKG		H1/H2 (5) 13
2 y 16	EYGMN y **Y**INTK**N**GEA**N**YVEEFKG		H1/H2 (5) 14
5 y 13	EFGM**S** y WINTKTGEATYVEEFKG	26 nM	H3 Completo (5) 19
	CDR-L1 y CDR-L2		
36 y 46	QNVGTN y YSASYRYS	3681 nM	pMS22
37 y 47	**A**NVG**N**N y **Y**LASNLSG	250 nM	pAC21 (3A1)
38 y 48	**K**NVGTN y **Y**LASY**PQI**	700 nM	pAC19 (2C6)
39 y 49	**AA**VGT**Y** y YSASYR**KR**	220 nM	pAC18 (2F1)
40 y 50	Q**YAS**TN y Y**W**ASYRYS	290 nM	pAC23 (2F11)
36 y __	QNVGTN y **P**LI-YSASYRYS	402 nM	H4E9
41 y 51	**H**NVGTN y YSAS**H**RYS	2255 nM	L2D2
42 y 52	Q**IMGPN** y YLASY**HE**S		pAC6 (C1)
43 y 53	Q**I**VGTN y YSAS**H**R**P**S		pAC7 (E10)
44 y 54	Q**K**V**L**TN y **Y**LASYRYS		pAC12 (H7)
45 y 55	QT**V**S**A**N y **Y**LASYRY**R**		pAC13 (H11)
	CDR-L3		
56	H Q Y Y T Y P L F T		pMS22

Fig. 34B

NOMBRE DEL CLON	CADENA	AFINIDAD MONOVALENTE	AFINIDAD BIVALENTE
PR1A3	wt/wt	k_{on}: $6.74x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $2.48x10^{-2}$ 1/s; KD $3681x10^{-9}$M	k_{on}: $2.82x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $5.52x10^{-4}$ 1/s; KD: $2x10^{-9}$M
1C8	hc/wt	k_{on}: $12.9x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.76x10^{-2}$ 1/s; KD $586x10^{-9}$M	k_{on}: $4.67x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $3.24x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.693x10^{-9}$M
H4E9	hc/wt	k_{on}: $5.22x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.21x10^{-2}$ 1/s; KD $402x10^{-9}$M	k_{on}: $2.92x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $2.04x10^{-3}$ 1/s; KD: $0.7x10^{-9}$M
H3 Completo (5) 19	hc/wt	k_{on}: $54.2x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.13x10^{-2}$ 1/s; KD $24x10^{-9}$M	k_{on}: $9.02x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $1.75x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.19x10^{-9}$M
H3 Completo (5) 8	hc/wt	k_{on}: $27.3x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.14x10^{-2}$ 1/s; KD $51x10^{-9}$M	N/D
3A1	wt/ lc	k_{on}: $46.8x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $1.17x10^{-2}$ 1/s; KD $250x10^{-9}$M	k_{on}: $2.42x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $3.64x10^{-4}$ 1/s; KD: $1.5x10^{-9}$M
2F1	wt/ lc	k_{on}: $95.7x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $2.07x10^{-2}$ 1/s; KD $220x10^{-9}$M	k_{on}: $4.23x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $4.10x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.952x10^{-9}$M
5L1A10	hc/wt	k_{on}: $15.6x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.09x10^{-2}$ 1/s; KD $59x10^{-9}$M	N/D
5HFF12	hc/wt	k_{on}: $20.8x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.09x10^{-2}$ 1/s; KD $44x10^{-9}$M	N/D
M4F1	hc/wt	k_{on}: $25.7x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.17x10^{-2}$ 1/s; KD 69x10-9M	N/D
H4E9 x 2F1	hc/lc	k_{on}: $36.4x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.35x10^{-2}$ 1/s; KD $96x10^{-9}$M	k_{on}: $4.23x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $1.91x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.452x10^{-9}$M
H4E9 x 3A1	hc/lc	N/D	k_{on}: $2.46x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $1.36x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.55x10^{-9}$M
1C8 x 2F1	hc/lc	k_{on}: $68.1x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: $0.87x10^{-2}$ 1/s; KD $128x10^{-9}$M	k_{on}: $9.68x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $6.36x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.66x10^{-9}$M
1C8 x 3A1	hc/lc	N/D	k_{on}: $2.89x10^{5}$ 1/Ms; k_{off}: $2.57x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.888x10^{-9}$M
H3 Full (5) 19 x 2F1	hc/lc	k_{on}: $206x10^{3}$ 1/Ms; k_{off}: 0.25x10-2 1/s; KD: $12.2x10^{-9}$M	k_{on}: $1.76x10^{6}$ 1/Ms; k_{off}: $2.84x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.16x10^{-9}$M
H3 Full (5) 8 x 2F1	hc/lc	N/D	k_{on}: $9.93x10^{5}$; 1/Ms; k_{off}: $2.71x10^{-4}$ 1/s; KD: $0.28x10^{-9}$M

Fig. 35

SEC ID nº	CONSTRUCTOS DE CDR-H3	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
25	PR1A3 CDR-H3	WDFYDYVEAMDY
33	5HFF12 CDR-H3	WDF**AH**Y**FQT**MDY
34	5L1A10 CDR-H3	WDF**AY**Y**FQT**MDY
217	PR1A3 (Y98A)	WDF**A**DYVEAMDY
218	PR1A3 (D99Y)	WDFY**Y**YVEAMDY
219	PR1A3 (D99H)	WDFY**H**YVEAMDY
220	PR1A3 (V101F)	WDFYDY**F**EAMDY
221	PR1A3 (E101aQ)	WDFYDYV**Q**AMDY
222	PR1A3 (A103T)	WDFYDYVE**T**MDY
223	PR1A3 (Y98A / D99Y)	WDF**AY**YVEAMDY
224	PR1A3 (W95Y)	**Y**DFYDYVEAMDY

Fig. 36

SEC ID nº	CONSTRUCTO DE CADENA PESADA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
225	CH7A (Y98A)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTVSS
226	CH7A (D99Y)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
227	CH7A (D99H)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTVSS
228	CH7A (V101F)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTTVTVSS
229	CH7A (E102Q)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVQAMDYWGQGTTVTVSS
230	CH7A (A103T)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVETMDYWGQGTTVTVSS
231	CH7A (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
232	CH7A (W95Y)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARYDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS
233	CH1A1A (Y98A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTVSS
234	CH1A1A (D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTTVTVSS

Fig. 37A

SEC ID nº	CONSTRUCTO DE CADENA PESADA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
235	CH1A1A (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTVSS
236	CH1A1A (V101F)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTTVTVSS
237	CH1A1A (E102Q)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVQAMDYWGQGTTVTVSS
238	CH1A1A (A103T)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVETMDYWGQGTTVTVSS
239	CH1A1A (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
240	CH1A1B (W95Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS
241	CH1A1B (Y98A)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTVSS
242	CH1A1B (D99Y)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
243	CH1A1B (D99H)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTVSS
244	CH1A1B (V101F)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTTVTVSS

Fig. 37B

SEC ID nº	CONSTRUCTO DE CADENA PESADA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
245	CH1A1B (E102Q)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVQAMDYWGQGTTVTVSS
246	CH1A1B (A103T)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVETMDYWGQGTTVTVSS
247	CH1A1B (Y98A / D99Y)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
248	CH1A1B (W95Y)	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS
261	CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS
262	CH1A1B	QVKLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS
263	CH1A1C	QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATY VEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVEAMDYWGQGTTVTVSS

Fig. 37C

CDR H1
CDR H2
CDR H3
Kabat VH
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 52a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66
PR1A3 Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH7A (Y98A) Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH7A (D99Y) Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH7A (D99H) Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH7A (Y98A/D99Y) Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH1A1A Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH1A1A (Y98A) Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH1A1A D99Y) Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH1A1A (D99H) Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
CH1A1A (Y98A/D99Y) Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E F G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E A T Y V E E F K G R
67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 100a 100b 100c 100d 100e 100f 100g 100h 100i 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
PR1A3 F V F S L D T S V S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R W D F Y D Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 281
CH7A (Y98A) F V F S L D T S V S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R W D F A D Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 225
CH7A (D99Y) F V F S L D T S V S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R W D F Y Y Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 226
CH7A (D99H) F V F S L D T S V S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R W D F Y H Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 227
CH7A (Y98A/D99Y) F V F S L D T S V S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R W D F A Y Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 231
CH1A1A V T F T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R W D F Y D Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 261
CH1A1A (Y98A) V T F T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R W D F A D Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 233
CH1A1A D99Y) V T F T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R W D F Y Y Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 234
CH1A1A (D99H) V T F T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R W D F Y H Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 235
CH1A1A (Y98A/D99Y) V T F T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R W D F A Y Y V E A M . . . . . D Y W G Q G T T V T V S S SEQ ID NO: 239

Fig. 38

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG

<120> ANTICUERPOS DE CEA

<130> 27344

<150> EP 11156665.9
<151> 2011-03-02

<160> 281

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 1

Glu Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada Kabat

<400> 2

Glu Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada 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 o Phe

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103)..(103)

<223> Xaa = Asp, His, Trp, Glu o Tyr

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

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

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (108)..(108)
<223> Xaa = Met o 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
```

<210> 5

<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada 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> Cadena ligera Variable Region

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

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

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa = Gly, Ser, Thr, o Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)
<223> Xaa = Thr, Asn, Pro, o Ala

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

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

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

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

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

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

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

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> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR1

<400> 57
ggatacacct tcactgagtt tggaatgaac
30

<210> 58
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR1

<400> 58

ggatacacct tcactgagta tggtatgaac
30

<210> 59
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR1

<400> 59
ggatacacct tcactgagta ttctatgaac
30

<210> 60

<400> 60
000

<210> 61
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR1

<400> 61
ggatacacct tcactgagtt tggaatgagc
30

<210> 62
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2

<400> 62
tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatgttgaag agtttaaggg a
51

<210> 63
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2

<400> 63

tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatattgaag agtttaaggg a
51

<210> 64
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2

<400> 64
tggataaaca ccaaaagtgg agaggcaaca tatgttgaag agtttaaggg a
51

<210> 65
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2

<400> 65
tatataaaca ccaaaaatgg agaggcaaac tatgttgaag agtttaaggg a
51

<210> 66
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2

<400> 66
tggataaaca ccaaaaatgg agaggcaaca tatattgaag agtttaaggg a
51

<210> 67
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 67
tgggacttct atgattacgt ggaggctatg gactac
36

<210> 68

<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 68
tgggacttct atcattacgt ggaggctatg gactac
36

<210> 69
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 69
tgggacttcg tggattacgt ggaggctatg gactac
36

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

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 70
tgggacttct attggtacgt ggaggctatg gactac
36

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

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 71
tgggacgcct ttgagtacgt gaaggcgctg gactac
36

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

<220>

<223> Cadena pesada CDR3

<400> 72
tgggatttct ttgagtattt taagactatg gactac
36

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

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 73
tgggactttt tttattacgt gcagactatg gactac
36

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

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 74
tgggattttt cttattacgt tgaggcgatg gactac
36

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

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 75
tgggactttg ctcattactt tcagactatg gactac
36

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

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 76
tgggacttcg cttattactt tcagactatg gactac
36

<210> 77
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

<400> 77
tgggatttcg cgtattacct tgaggctatg gactac
36

<210> 78
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 78
aaggccagtc agaatgtggg tactaatgtt gcc
33

<210> 79
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 79
aaggccagtg ccaatgtggg taataatgtt gcc
33

<210> 80
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 80
aaggccagta agaatgtggg gactaatgtt gcg
33

<210> 81
<211> 33
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 81
aaggccagtg cggctgtggg tacgtatgtt gcg
33

<210> 82
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 82
aaggccagtc agatagcgag tactaatgtt gcc
33

<210> 83
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 83
aaggccagtc acaatgtggg taccaacgtt gcg
33

<210> 84
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 84
aaggccagtc agattatggg tcctaatgtt gcg
33

<210> 85
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 85
aaggccagtc aaattgtggg tactaatgtt gcg
33

<210> 86
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 86
aaggccagtc agaaggtgct tactaatgtt gcg
33

<210> 87
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 87
aaggccagtc agactgtgag tgctaatgtt gcg
33

<210> 88
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 88
tattcggcat cctaccgcta cagt
24

<210> 89
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 89
tatttggcct ccaacctctc cggt
24

<210> 90
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 90
tacctggcat cctaccccca gatt
24

<210> 91
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 91
tattcggcat cctaccgcaa aagg
24

<210> 92
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 92
tattgggcat cctaccgcta tagt
24

<210> 93
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 93
tattcggcat cccaccggta cagt
24

<210> 94
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 94
tatttggcat cctaccacga aagt
24

<210> 95
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 95
tattcggcat cccaccgtcc cagt
24

<210> 96
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 96
tatttggcat cctaccgcta cagt
24

<210> 97
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR2

<400> 97
tatttggcat cctaccgcta caga
24

<210> 98
<211> 30
<212> ADN
<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

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

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

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

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

<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

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

<400> 109

000

<210> 110

<400> 110
000

<210> 111
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 VH

<400> 111
caggtgaagc tgcagcagtc aggacctgag ttgaagaagc ctggagagac agtcaagatc
60

tcctgcaagg cttctggata taccttcaca gaattcggaa tgaactgggt gaagcaggct
120

cctggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgccttc tctttggaga cctctgccac cactgcctat
240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctaaat atttctgtgc tcgatgggat
300

ttctatgact atgttgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc
360

tca
363

<210> 112
<211> 362
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pEM1496

<400> 112
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagttggaat gaactgggtg cgacaggccc
120

ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga taaacaccaa aactggagag gcaacatatg
180

ttgaagagtt taagggacgg tttgtcttct ccttggacac ctctgtcagc acggcatatc
240

tgcagatcag cagcctaaag gctgacgaca ctgccgtgta ttactgtgcg agatgggact
300

tctatgatta cgtggaggct atggactact ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct
360

ca
362

<210> 113
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH7A

<400> 113
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 114
<211> 294
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 114
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact agctatgcta tgaattgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacca acactgggaa cccaacgtat
180

gcccagggct tcacaggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gaga
294

<210> 115
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 VL

<400> 115
gatatcgtga tgacccagtc tcaaagattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc
60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca acagaaacca
120

ggacaatccc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat
180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtacagtct
240

gaagacttgg cggagtattt ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgttcggc
300

tcggggacaa agttggaaat gaaacgtacg
330

<210> 116
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pEM1495

<400> 116
gacatccaga tgactcagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc
60

atcacctgta aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtacca gcagaagcca
120

ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcatcctacc ggtacagtgg tgtgccaagc
180

agattcagcg gtagcggtag cggtaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctccagcca
240

gaggacatcg ccacctacta ctgccaccaa tattacacct atcctctatt cagcttcggc
300

caagggacca aggtggaaat caaacgt
327

<210> 117
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CL1A

<400> 117
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caag
324

<210> 118
<211> 285
<212> ADN
<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 gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccct
285

<210> 119
<211> 369
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH7 rF9

<400> 119
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga atctggaga ggcaacctat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tcagctagc
369

<210> 120
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CLA1 rH11

<400> 120
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca gactgtgagt gctaatgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcatcctacc gctacagagg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 121
<211> 987
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IgG1

<400> 121
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca
60

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac
120

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc
180

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc
240

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagcaga gcccaaatct
300

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca
360

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc
420

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg
480

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg
540

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
600

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc
660

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc
720

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg
780

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac
840

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag
900

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag
960

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

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> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador MS-43

<400> 123
ccagccggcc atggccgata tccagatgac ccagtctcca tc
42

<210> 124
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador MS-52

<400> 124
gaagaccgat gggcctttgg tgctag
26

<210> 125
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador MS-55

<400> 125
gcaacatatg ttgaagagtt taagggacgg
30

<210> 126
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> MS-56

<400> 126
atgaactggg tgcgacaggc ccctg
25

<210> 127
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-679

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(28)
<223> n is a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> w is a o t

<400> 127
caggggcctg tcgcacccag ttcatmnnaw actcagtgaa ggtgtatcca gaagcc
56

<210> 128
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-680

<400> 128
ccgtccctta aactcttcaa cataggttgc ctctccagtt ttggtgttta tccatcccat
60

ccactcaagc ccttgtccag g
81

<210> 129
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-685

<400> 129
cagctatgac catgattacg ccaagcttgc atgcaaattc tatttcaagg
50

<210> 130
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-686

<400> 130
gttgcgtggt atcagcagaa accaggg
27

<210> 131
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-687

<400> 131
gctctttgtg acgggcgagc tcaggccctg atgg
34

<210> 132
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-688

<400> 132
ggagtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgg
35

<210> 133
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-681

<400> 133
cctggtttct gctgatacca cgcaacatta gtacccacat tctgactggc cttgcaagtg
60

atggtgactc
70

<210> 134
<211> 77
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-682

<400> 134

ctgccactga accttgatgg gactccactg tagcggtagg atgccgaata gatcaggagc
60

ttaggtgctt tccctgg
77

<210> 135
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC7

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(39)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 135
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaagtcmnnt ctcgcacagt aatacacggc
60

agtg
64

<210> 136
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC8

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 136
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaamnnccat ctcgcacagt aatacacggc
60

agtg
64

<210> 137
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC9

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 137
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata mnngtcccat ctcgcacagt aatacacggc
60

agtg
64

<210> 138
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC10

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 138
ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcmnn gaagtcccat ctcgcacagt aatacacggc
60

agtg
64

<210> 139
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC11

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 139
ccagtagtcc atagcctcca cgtamnnata gaagtcccat ctcgcacagt aatacacggc
60

agtg
64

<210> 140
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC12

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(39)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 140
cgtggtccct tggccccagt agtccatagc ctccacmnna tcatagaagt cccatctcgc
60

acag
64

<210> 141
<211> 64

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC13

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 141
cgtggtccct tggccccagt agtccatagc ctcmnngtaa tcatagaagt cccatctcgc
60

acag
64

<210> 142
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC14

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 142
cgtggtccct tggccccagt agtccatagc mnncacgtaa tcatagaagt cccatctcgc
60

acag
64

<210> 143
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC15

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 143
cgtggtccct tggccccagt agtccatmnn ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc
60

acag
64

<210> 144
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC16

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 144
cgtggtccct tggccccagt agtcmnnagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc
60

acag
64

<210> 145
<211> 77
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC17

<400> 145
cgtggtccct tggccccagt agtccatagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc
60

acagtaatac acggcag
77

<210> 146
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-749

<400> 146
ccatcagggc ctgagctcgc ccgtc
25

<210> 147
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-750

<400> 147
cgtggaggct atggactact ggggccaagg
30

<210> 148
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-751

<400> 148
gactactggg gccaagggac cacggtcac
29

<210> 149
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-752

<400> 149

ggtcagggcg cctgagttcc acg
23

<210> 150
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC1

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(39)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 150
ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggata ggtgtamnnt tggtgacagt agtaagttgc
60

<210> 151
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC2

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 151
ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggata ggtmnnatat tggtgacagt agtaagttgc
60

<210> 152
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC3

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 152
ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggata mnngtaatat tggtgacagt agtaagttgc
60

<210> 153
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC4

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 153
ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggmnn ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc
60

<210> 154
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador AC5

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> m is a o c

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(24)
<223> n is a, c, g, o t

<400> 154
ggtgccctgg ccaaacgtga amnnaggata ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc
60

<210> 155
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificials

<220>
<223> Cebador AC6

<400> 155
ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggata ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc
60

<210> 156
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador EAB-746

<400> 156
cgcttgatct cgagcttggt gccctggcca aacgtg
36

<210> 157

<400> 157
000

<210> 158
<211> 428
<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

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 His
420 425

<210> 159
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PMS22

<400> 159
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 160
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 1C8

<400> 160
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatcatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 161
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3E1

<400> 161
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttcgtggatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 162
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 2D7

<400> 162
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctattggt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 163
<211> 363

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 163
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

tttgctcatt actttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 164
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 164
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttcgcttatt actttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 165
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de afinidad madurada

<400> 165
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat
300

ttcgcgtatt accttgaggc tatggactac tggggccaag ggaccacgat caccgtctcc
360

tca
363

<210> 166
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3 Completo (5) 19

<400> 166
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgagctgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac
300

gcctttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 167
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3 Completo (5) 8

<400> 167
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat
300

ttctttgagt attttaagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 168
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3 Completo (5) 28

<400> 168
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttttttttatt acgtgcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 169
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3 Completo (5) 27

<400> 169
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat
300

ttttcttatt acgttgaggc gatggactac tggggccaag ggaccacagt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 170
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H4E9 Cadena pesada

<400> 170

caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaatacca aaactggaga ggcaacttat
180

attgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 171
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC14 (B9)

<400> 171
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaagtggaga ggcaacctat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 172
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC15 (F9)

<400> 172
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 173
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H1/H2 (5) 2

<400> 173
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtattcta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatac ataaacacca aaaatggaga ggcaaactat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 174
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H1/H2 (5) 11

<400> 174
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaaatggaga ggcaacctat
180

attgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 175
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H1/H2 (5) 13

<400> 175
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat ataaacacca aaaatggaga ggcaaactat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggacg cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 176
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H1/H2 (5) 14

<400> 176
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat ataaacacca aaaatggaga ggcaaactat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 177
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3 Completo (5) 19

<400> 177
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgagctgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac
300

gcctttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 178
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC21 (3A1)

<400> 178
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtgc caatgtgggt aataatgttg cctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcctccaacc gctccggtgg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 179
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC19 (2C6)

<400> 179
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtaa gaatgtgggg actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagcccct gatctacctg gcatcctacc cccagattgg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcccctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 180
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC18 (2F1)

<400> 180
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 181
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC23 (2F11)

<400> 181
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca gatagcgagt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattgg gcatcctacc gctatagtgg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 182
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H4E9 cadena ligera

<400> 182
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttg cctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagcccct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 183
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L2D2

<400> 183
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca caatgtgggt accaacgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcccacc ggtacagtgg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 184
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC6 (C1)

<400> 184
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca gattatgggt cctaatgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc acgaaagtgg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc
300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg
330

<210> 185
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC7 (E10)

<400> 185
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca aattgtgggt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcccacc gtcccagtgg 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> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC12 (H7)

<400> 186
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca gaaggtgctt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc gctacagtgg 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> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pAC13 (H11)

<400> 187
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc
60

atcacttgca aggccagtca gactgtgagt gctaatgttg cgtggtatca gcagaaacca
120

gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcatcctacc gctacagagg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca 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>
<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

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

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

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 Completo (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

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 Completo (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 Completo (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 Completo (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

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

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

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

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>
<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 Completo (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

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

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

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

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> cadena ligera H4E9

<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

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

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

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

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

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

<210> 217
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PR1A3 (Y98A) Cadena pesada CDR3

<400> 217

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

<210> 218
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 (D99Y) Cadena pesada CDR3

<400> 218

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

<210> 219
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 (D99H) Cadena pesada CDR3

<400> 219

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

<210> 220
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 (V101F) Cadena pesada CDR3

<400> 220

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

<210> 221
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 (E101aQ) Cadena pesada CDR3

<400> 221

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

<210> 222
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 (A103T) Cadena pesada CDR3

<400> 222

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

<210> 223
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 (Y98A / D99Y) Cadena pesada CDR3

<400> 223

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

<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3 (W95Y) Cadena pesada CDR3

<400> 224

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

<210> 225
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (Y98A)

<400> 225

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 226
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (D99Y)

<400> 226

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 227
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (D99H)

<400> 227

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 228
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (V101F)

<400> 228

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 229
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (E102Q)

<400> 229

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 230
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (A103T)

<400> 230

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 231
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (Y98A / D99Y)

<400> 231

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 232
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo de cadena pesada CH7A (W95Y)

<400> 232

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 233
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (Y98A)

<400> 233

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 234
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (D99Y)

<400> 234

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 235
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (D99H)

<400> 235

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 236
<211> 121

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (V101F)

<400> 236

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 237
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (E102Q)

<400> 237

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 238
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (A103T)

<400> 238

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 239
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (Y98A / D99Y)

<400> 239

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 240
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A (W95Y)

<400> 240

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 241
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (Y98A)

<400> 241

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 242
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (D99Y)

<400> 242

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 243
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (D99H)

<400> 243

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 244
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (V101F)

<400> 244

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 245
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (E102Q)

<400> 245

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 246
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (A103T)

<400> 246

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 247
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (Y98A / D99Y)

<400> 247

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 248
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B (W95Y)

<400> 248

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 249
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo de cadena pesada CH7A (Y98A)

<400> 249
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttcgctgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca
363

<210> 250
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo de cadena pesada CH7A (D99Y)

<400> 250
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctattatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 251
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo de cadena pesada CH7A (D99H)

<400> 251
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatcatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 252
<211> 364
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (V101F)

<400> 252
ccaggtgcag ctggtgcaat ctgggtctga gttgaagaag cctggggcct cagtgaaggt
60

ttcctgcaag gcttctggat acaccttcac tgagtttgga atgaactggg tgcgacaggc
120

ccctggacaa gggcttgagt ggatgggatg gataaacacc aaaactggag aggcaacata
180

tgttgaagag tttaagggac ggtttgtctt ctccttggac acctctgtca gcacggcata
240

tctgcagatc agcagcctaa aggctgaaga cactgccgtg tattactgtg cgagatggga
300

cttctatgat tacttcgagg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc
360

ctca
364

<210> 253
<211> 364
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (E102Q)

<400> 253
ccaggtgcag ctggtgcaat ctgggtctga gttgaagaag cctggggcct cagtgaaggt
60

ttcctgcaag gcttctggat acaccttcac tgagtttgga atgaactggg tgcgacaggc
120

ccctggacaa gggcttgagt ggatgggatg gataaacacc aaaactggag aggcaacata
180

tgttgaagag tttaagggac ggtttgtctt ctccttggac acctctgtca gcacggcata
240

tctgcagatc agcagcctaa aggctgaaga cactgccgtg tattactgtg cgagatggga
300

cttctatgat tacgtgcagg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc
360

ctca
364

<210> 254
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (A103T)

<400> 254
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttctatgatt acgtggagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 255
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (Y98A / D99Y)

<400> 255

caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac
300

ttcgcttatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 256
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo de cadena pesada CH7A (W95Y)

<400> 256
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat
180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat
240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatacgac
300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 257
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1

<400> 257

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 258
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A2

<400> 258

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

```
          35                  40                  45

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 259
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A3

<400> 259

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 260
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A4

<400> 260

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 261
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A

<400> 261

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 262
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B

<400> 262

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 263
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1C

<400> 263

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 264
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1D

<400> 264

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 265
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1E

<400> 265

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 266
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1F

<400> 266

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 267
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1G

<400> 267

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 268
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1

<400> 268
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accctggaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 269
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A2

<400> 269
caggtcaaac tgcagcagag cggccctgag ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc
60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggca
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 270
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A3

<400> 270
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt caagcaggcc
120

cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 271
<211> 362
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A4

<400> 271
aggtgcagct ggtgcagtct ggcgccgaag tgaagaaacc tggcgccagc gtgaaggtgt
60

cctgcaaggc cagcggctac accttcaccg agttcggcat gaactgggtc cgacaggcac
120

caggccaggg cctcgaatgg atgggctgga tcaacaccaa gaccggcgag gccacctacg
180

tggaagagtt caagggcaga ttcgccttca gcctggaaac cagcgccacc accgcctacc
240

tgcagatcaa caacctgaag aacgaggata ccgccaagta cttctgcgcc agatgggact
300

tctacgatta cgtggaagcc atggactact ggggccaggg caccaccgtg accgtgtcta
360

gc
362

<210> 272
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1A

<400> 272
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 273
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1B

<400> 273
caggtgaagc tgcagcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 274
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1C

<400> 274
caggtgcagc tggtgcagtc tggccccgaa ctgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 275
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1D

<400> 275
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagagac tgtgaagatc
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 276
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1E

<400> 276
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag attcaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 277
<211> 363

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1F

<400> 277
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac
240

ctggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 278
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A1G

<400> 278
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct
120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac
180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac
240

atggaaatcc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac
300

ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct
360

agc
363

<210> 279
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A

<400> 279

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 280
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1A

<400> 280
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgcctc ggtgaaggtc
60

tcctgcaagg cctctggtta cacatttacg gaattcggga tgaattgggt cagacaagca
120

cctgggcaag ggctcgagtg gatgggatgg ataaacacga agacaggcga ggccacctac
180

gtagaagagt tcaaaggaag ggtcacgatg accacagata cttctacctc tactgcgtat
240

atggaactac ggagcttgcg tagcgatgac acagcggtgt actattgtgc tcgatgggat
300

ttctatgact atgttgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc
360

tca
363

<210> 281
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PR1A3

<400> 281

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

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

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

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

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

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

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

```
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

5

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/EP2012/053390	29.02.2012	02.03.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/30

Applicant
ROCHE GLYCART AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ 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 Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and 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

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Ferreira, Roger Telephone No. +49 89 2399-0

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2012/053390

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established 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)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   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 purposes of search

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing 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.

5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

   see separate sheet

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	4-9, 14-23
	No:	Claims	1-3, 10-13, 24-45
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-45
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-45
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

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

Reference is made to the following documents:

D1 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, HARCOURT PUBLISHERS, vol. 101, no. 10, 17 November 2009 (2009-11-17), pages 1758-1768, XP002609361,ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/SJ.BJC.6605355

D2 CONAGHAN P J 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, HARCOURT PUBLISHERS, vol. 98, no. 7, 8 April 2008 (2008-04-08), pages 1217-1225, XP002609357, ISSN: 0007-0920 [retrieved on 2008-03-18]

D3 STEWART L M ET AL: "Humanisation and characterisation of PR1A3, a monoclonal antibody specific for cell- bound carcinoembryonic antigen", CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE, vol. 47, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 299-306, XP002970718, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S002620050534 cited in the application

D4 GARAMBOIS VÉRONIQUE ET AL: "Fully human IgG and IgM antibodies directed against the carcinoembryonic antigen (CEA) Gold 4 epitope and designed for radioimmunotherapy (RIT) of colorectal cancers",BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 4, no. 1, 15 October 2004 (2004-10-15), page 75, XP021004678,ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-4-75

D5 WO 95/06067 A1 (IMP CANCER RES TECH [GB]; BODMER WALTER FRED [GB]; DURBIN HELGA [GB];) 2 March 1995 (1995-03-02) cited in the application

D6 HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy",TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495,ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2003.08.007

D7 DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding",IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292,ISSN: 1380-2933, DOI: 10.1016/S1380-2933(96)00045-0

Subject-matter of the claims

The claims relate to a **variant antigen binding molecule** (**ABM**) which **binds membrane-bound human carcinoembryonic antigen** (**CEA**; also known as **CEACAM5**, **CD66e**), wherein the ABM is **stable** at a **temperature** that is **at least 0.5**, **1.0**, **1.5** or **2.0 degree Celsius higher** than **PR1A3** antibody or a **humanized version** of PR1A3 antibody. Said ABM wherein the **VH** comprises an amino acid sequence that is **at least 95% identical** to a sequence selected from the group consisting of **SEQ ID Nos. 234**, **235**, **239**, **241**, **242** and **247** and wherein the **VL** comprises an amino acid sequence that is **at least 95% identical** to the sequence of **SEQ ID No. 209** is also claimed. The claims further relate to **glycoengineered** versions of said ABM, as well as the use of said ABM in **therapeutical applications**.

Re Item II

1 **Priority**

This preliminary opinion is being established under the assumption that the entire subject-matter is entitled to the claimed priority. If this is not the case, the "P/X" documents cited in the search report may have to be considered for the assessment of novelty and inventive step.

Re Item V

1 **Novelty, Article 33(2) PCT**

1.1 The present application does not meet the criteria of Article 33 (1) PCT, because the subject-matter of claims 1-3, 10-13 and 24-45 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

1.2 D1 discloses (see, *e.g.* abstract; materials and methods; results; figures 1-7; table I) variant humanized versions of the anti-CEA antibody PR1A3, as well as glycoengineered versions thereof. This document further discloses the use of said antibodies in therapeutic applications.

Due to the fact that the expression referring to the ABM being "stable at a temperature that is at least 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 degree Celsius higher than PR1A3 antibody or a humanized version of PR1A3 antibody" is considered unclear (see Re Item VIII.1.2 hereinafter), the features present therein are not regarded as limiting the scope of claim 1.

As a consequence, D1 is considered to anticipate the subject-matter of claims 1-3, 10-13 and 24-45.

1.3 For the sake of completeness, it is pointed out that each of the documents **D2** (see, *e.g.* abstract; materials and methods; results; figures 1-78 table I), **D3** (see, *e.g.* abstract; materials and methods; results; figures 1-5), **D4** (see, *e.g.* abstract; methods; results; figures 1-4; tables 1 and 2) and **D5** (see, *e.g.* abstract; page 1, line 1 to page 17, line 2; claims 1-18; figures 1-14; examples 1-8) also anticipates the subject-matter of claims 1-3, 10-13 and 24-45.

1.4 Claims 4-9 and 14-23 appear to be novel in view of the cited prior art documents.

2 Inventive step, Sufficiency of disclosure and Support, Articles 33(3), 5 and 6 PCT

2.1 As far as the claims employ antibodies only characterized by part of their sequence (*e.g.* only one variable region, only some of the CDRs or various combinations of CDRs, as well as various variants thereof), they do not fulfil the requirements of Articles 33(3), 5 and 6 PCT:

The present application only discloses antibodies comprising specific VL and VH regions (see, *e.g.* figures 33 and 37 and examples 1-8).

It is well established in the art that the formation of an intact antigen-binding site as well as the maintenance of the antigen-binding specificity and affinity critically depends on the amino acid sequence and conformations of each CDRs of the light and heavy chains.

It is further expected that all CDRs in the proper order and in the context of the framework sequences which maintain their required conformation, are required to produce a polypeptide having functional antigen-binding sites. D6, for example, discloses (see, *e.g.* abstract) that a single CDR is not sufficient to give rise to a functional antibody molecule.

Accordingly, it is unlikely that all the antibodies encompassed by present claims 4-8, 14 and 17-20 have the required function and thus solve the technical problem underlying the invention (Article 33(3) PCT). Indeed, since the sequences mentioned in the present claims allow for a less than 100% identity and in view of the importance of the role played by each single amino acid in the binding of an antibody to its target, especially at the level of its CDRs, claim directed to an antibody which is structurally characterised by less than the full sequence of the CDRs does not represent the solution to the technical problem underlying said claims and cannot therefore be considered to involve an inventive step.

Moreover, it is not sufficient to characterize an antibody by only one, two or three CDR sequences (or various combinations or variants thereof) since antigen-binding specificity depends on all three CDRs and four framework regions (which hold said CDRs in the correct conformation) of each of the heavy and light chains (*i.e.* 6 CDRs in total). The specification of one CDR in the absence of the other CDR sequences or various combinations of different CDR sequences or variants thereof is therefore unlikely to provide all essential features of the antibody (Article 5 PCT). D7, for example, teaches (see, *e.g.* abstract and discussion) that all three CDRs of camelised VH are responsible for affinity and antigen-binding. Moreover, D6 teaches (see, *e.g.* pages 485-486 under "Biological properties") that due to aggregation, low expression level and low stability, the generation of only VL or VH is not possible as long as they are not camelised. Since there is no teaching in the present application of how to obtain such VL or VH sequence from the disclosed antibodies, the claims concerned lack support (Article 6 PCT).

As a consequence, claims 4-8, 14 and 17-20 are not considered to meet the requirements of Articles 33(3), 5 and 6 PCT.

2.2 The same reasoning as given above under Re Item V. 2.1 applies *mutatis mutandis* to claims 10-13, 15, 16, 21, 22 and 24-45 relating to nucleic acids encoding said antibodies, vectors and host cells comprising said nucleic acids

and the use of said antibodies in therapeutic applications.
Claims 10-13, 15, 16, 21, 22 and 24-45 appear not to fulfil the requirements of Articles 33(3), 5 and 6 PCT.

2.3 The subject-matter of claims 9 and 23 is not considered inventive for the following reasons:

In absence of an apparent surprising technical effect associated to the antibodies referred to in claims 9 and 23 over the antibodies already disclosed in the prior (*e.g.* the antibodies disclosed in one of the closest prior art documents D1-D5), no inventive step could be acknowledged for the subject-matter of these claims. Indeed, the **selection** of a further humanised anti-CEA antibody without any assigned function or apparent surprising technical effect (*i.e.* one of the antibodies referred to in claims 9 and 23) from a group of humanised anti-CEA antibodies, obtainable from the methods described in D1-D5, which methods are the same as, or equivalent to, the ones used in the present application, is considered **arbitrary** and thus not inventive.
Claims 9 and 23 are therefore not regarded as complying with the requirements of Article 33(3) PCT.

Re Item VI

1 **Certain published documents**

1.1 PCT/EP2010/062527 filed on 27-08-2010, published as WO 2011/023787 on 03-03-2011 and claiming priority of US 61/238,505 filed on 31-08-2009 (P) cited in the application

1.2 PCT/EP2010/064209 filed on 24-09-2010, published as WO 2011/039126 on 07-04-2011 and claiming priority of EP 09171659.7 filed on 29-09-2009 (P)

Re Item VIII

1 **Sufficiency of disclosure, Support and Clarity, Articles 5 and 6 PCT**

1.1 Claims 1, 2, 12-15, 21, 22 and 25-30 do not meet the requirements of Article 6 PCT because the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the **result to be achieved**, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. The absence of a structural/technical definition of the compounds of claims 1,

2, 12-15, 21, 22 and 25-30 gives rise to a lack of **features** which are considered **crucial** and **essential** to carry out the invention over the whole scope claimed (Articles 5 and 6 PCT).

1.2 Furthermore, the expression "wherein the ABM is stable at a temperature that is at least 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 degree Celsius higher than PR1A3 antibody or a humanized version of PR1A3 antibody" used in claims 1 and 14 is considered vague in that it is not clear which is the "reference" temperature to be taken into account for any kind of comparison. Moreover, Applicant's attention is brought to the fact that, even if a "reference" temperature is defined, said expression may also refer to a situation where the variant ABM and the "reference" antibody (PR1A3 or humanised version thereof) are both stable. Indeed, said expression does not refer to a temperature where the variant ABM is stable, whereas the "reference" antibody is unstable.
For the following reasons, claims 1 and 14 are regarded as infringing Article 6 PCT.

1.3 The terms "**variant**", used in claims 1 and 9, and "**about**", used in claims 25-27 and 30, are vague and unclear and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which they refer, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear, Article 6 PCT.

1.4 Claim 45 is considered to infringe Article 6 PCT in that it is not clear to which entity or process its subject-matter refers.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

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. (firma: ilegible)

BV 306/2011

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

TRADUCTORA OFICIAL
R.M. 2177/89 MINJUSTICIA
ANITA L... ...AR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2011 MAY 26 A 6:50

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

071152
Anita Escobar.
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Fotocopia fiel

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

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 socledad 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

(firma: ilegible)

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.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2011 MAY 26 A 6:50

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

071152

Anita Escobar.
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Los abajo firmados,

Roche Glycart AG

con domicilio en

Wagistrasse 18
CH-8952 Schlieren (Suiza)

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.

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.

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.

Dado y firmado

The undersigned,

Roche Glycart AG

domiciled at

Wagistrasse 18
CH-8952 Schlieren (Switzerland)

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, 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.

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.

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.

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
NOTAR BASEL

BV 306/2011

APOSTILLE
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by ..... Dr. iur. Chr. Nertz .....
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 14. April 2011
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....
8. no. 2473 / 5209
9. Seal / stamp: 10. Signature:

Hanna Lauener

STATE CHANCERY * BASLE-CITY *

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:

B a s e l (Switzerland), this 13th (thirteenth) day of July 2010 (two thousand and ten).

Dr. iur. A. Schlageter, notary

BV 165/2010

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by Dr. iur. A. A. Schlageter
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. 2855/6082
9. Seal/stamp: STATE CHANCERY * BASLE-CITY *
10. Signature: H. Lauener
Hanna Lauener

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 September 2012 (07.09.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/117002 A1

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

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/053390

(22) International Filing Date:
29 February 2012 (29.02.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11156665.9 2 March 2011 (02.03.2011) EP

(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]; Buhnrain 8, CH-8052 Zuerich (CH). **HOSSE, Ralf** [DE/CH]; Schmiedstrasse 8, CH-6330 Cham (CH). **MOESSNER, Ekkehard** [DE/CH]; Felsenburgweg 5, CH-8280 Kreuzlingen (CH). **UMANA, Pablo** [CR/CH]; Felsenrainstrasse 28, CH-8832 Wollerau (CH).

(74) Agent: **KUENG, Peter**; 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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, 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, RS, 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**: CEA ANTIBODIES

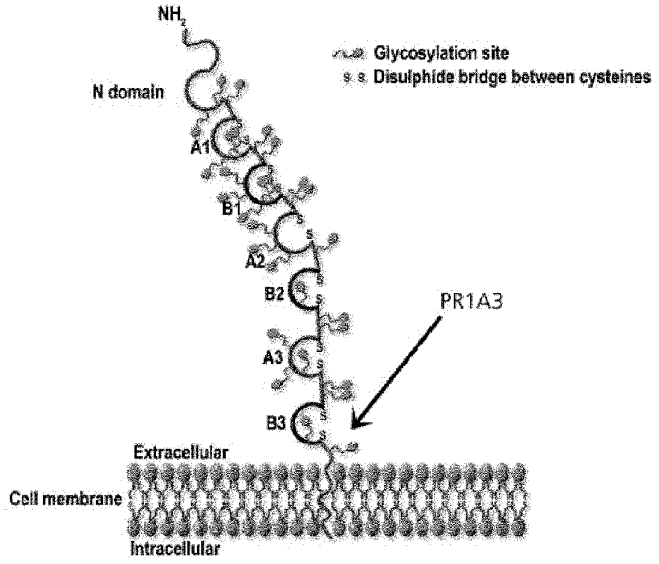


Fig. 1

(57) **Abstract**: The present invention provides antigen binding molecules (ABMs) which bind membrane-bound CEA, including ABMs with improved therapeutic properties, and methods of using the same.

WO 2012/117002 A1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 27344 WO	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/EP2012/053390	International filing date *(day/month/year)* 29/02/2012	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 02/03/2011
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.

[X] 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:
      [X] 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 43.6*bis*(a)).
   c. [X] 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,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2, 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. 1
      [ ] as suggested by the applicant
      [X] 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/EP2012/053390

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c 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/EP2012/053390

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, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	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, HARCOURT PUBLISHERS, vol. 101, no. 10, 17 November 2009 (2009-11-17), pages 1758-1768, XP002609361, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/SJ.BJC.6605355 the whole document	1-45

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 April 2012	07/05/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Ferreira, Roger

3

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

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CONAGHAN P J 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, HARCOURT PUBLISHERS, vol. 98, no. 7, 8 April 2008 (2008-04-08), pages 1217-1225, XP002609357, ISSN: 0007-0920 [retrieved on 2008-03-18] the whole document	1-45
X	STEWART L M ET AL: "Humanisation and characterisation of PR1A3, a monoclonal antibody specific for cell-bound carcinoembryonic antigen", CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE, vol. 47, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 299-306, XP002970718, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S002620050534 cited in the application the whole document	1-45
X	GARAMBOIS VÉRONIQUE ET AL: "Fully human IgG and IgM antibodies directed against the carcinoembryonic antigen (CEA) Gold 4 epitope and designed for radioimmunotherapy (RIT) of colorectal cancers", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 4, no. 1, 15 October 2004 (2004-10-15), page 75, XP021004678, ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-4-75 the whole document	1-45
X	WO 95/06067 A1 (IMP CANCER RES TECH [GB]; BODMER WALTER FRED [GB]; DURBIN HELGA [GB];) 2 March 1995 (1995-03-02) cited in the application the whole document in particular abstract page 1, line 1 - page 17, line 2 claims 1-18; figures 1-14; examples 1-8	1-45

-/--

3

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2003.08.007 the whole document	1-45
Y	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding", IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292, ISSN: 1380-2933, DOI: 10.1016/S1380-2933(96)00045-0 the whole document	1-45
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 ; CLINICAL AND MOLECULAR GASTROENTEROLOGY AND SURGERY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 20, no. 5, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 403-414, XP019340241, ISSN: 1432-1262, DOI: 10.1007/S00384-004-0726-X the whole document	1-45
A	DURBIN H ET AL: "An epitope on carcinoembryonic antigen defined by the clinically relevant antibody PR1A3", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 91, no. 10, 10 May 1994 (1994-05-10), pages 4313-4317, XP002609359, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.91.10.4313 cited in the application the whole document	1-45

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROBERT WILKINSON ET AL: "Evaluation of a transgenic mouse model for anti-human CEA radioimmunotherapeutics.", THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 43, no. 10, 1 October 2002 (2002-10-01), pages 1368-1376, XP55024211, ISSN: 0161-5505 the whole document	1-45
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, JOHN WILEY & SONS, INC, UNITED STATES, SWITZERLAND, GERMANY, vol. 97, no. 4, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 542-547, XP002609360, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/IJC.1630 the whole document	1-45
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, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 254, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 392-403, XP000199739, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1006/JMBI.1995.0626 the whole document	1-45
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: 10.1016/J.MOLIMM.2008.07.013 [retrieved on 2008-08-21] the whole document	1-45
X,P	WO 2011/023787 A1 (ROCHE GLYCART AG [CH]; HOFER THOMAS U [CH]; HOSSE RALF [CH]; MOESSNER) 3 March 2011 (2011-03-03) cited in the application the whole document	1-45

-/--

3

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2011/039126 A1 (ROCHE GLYCART AG [CH]; BRUENKER PETER [CH]; FERRARA KOLLER CLAUDIA [CH) 7 April 2011 (2011-04-07) the whole document -----	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/053390

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 H09501571 A	18-02-1997
		PT 721470 E	31-03-2003
		US 5965710 A	12-10-1999
		WO 9506067 A1	02-03-1995
WO 2011023787 A1	03-03-2011	AR 078111 A1	12-10-2011
		AU 2010288469 A1	01-03-2012
		CA 2770174 A1	03-03-2011
		TW 201121994 A	01-07-2011
		US 2011104148 A1	05-05-2011
		WO 2011023787 A1	03-03-2011
WO 2011039126 A1	07-04-2011	AU 2010303142 A1	15-03-2012
		WO 2011039126 A1	07-04-2011

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ___ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 12-07-13
(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***
	11156665.9	02-03-11	EP

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 02-10-13
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: *29-02-12*
No. de solicitud: ***PCT/EP2012/053390***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***07-09-12***
No. Publicación: ***WO 2012/117002 A1***

(54) Titulo: **ANTICUERPOS DEL CEA**

(57) Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-
La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno (ABMs) que se unen a CEA unido a membrana, incluyendo ABMS con propiedades terapéuticas mejoradas, y métodos de utilización de las mismas.

Sector: Biotecnología, específicamente anticuerpos monoclonales recombinantes incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados que se unen al antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y composiciones que los contienen, útiles para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer gástrico, cáncer pancreático o cáncer de mama.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 12-07-13
(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***
	11156665.9	02-03-11	EP

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 02-10-13
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: *29-02-12*
No. de solicitud: ***PCT/EP2012/053390***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***07-09-12***
No. publicación: ***WO 2012/117002 A1***

(54) Titulo: **ANTICUERPOS DEL CEA**

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 00127/13 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 11 de julio de 2013 por el Sr. Gabriel Ricaurte Echeverri, c. c. 25965 de Bogotá, Traductor Oficial según resolución No. 3987 de agosto 17 de 1981 expedida por el Ministerio de Justicia.

Caso 27344

Para copia fiel

Traspaso

Yo/ Nosotros, los suscritos

Thomas U. Hofer, científico investigador, un ciudadano Suizo
Buhnrain 8
CH-8052 Zúrich, Suiza

Ralf Hosse, científico investigador, un ciudadano Alemán
Schmiedstrasse 6/8
CH-6330 Cham, Suiza

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Ekkehard Moessner, científico investigador, un ciudadano Alemán
Feisenburgweg 5
CH-8280, Kreuzlingen, Suiza

Pablo Umaña, científico jefe, un ciudadano Costarricense
Fuhrstrasse 24a
CH-8820, Waedenswil, Suiza

LOS CEDENTES, con este documento declaran que Yo/Nosotros soy/somos el (los) único (s) inventor(s) de la invención titulada:

ANTICUERPOS DE CEA

Para la cual se presentó la (s) primera(s) solicitud (es) como sigue:

País	Fecha de Presentación	No. de Serial
27344 EP	02.03.2011	1116665.9

Y a título oneroso, cuyo recibo suficiente se reconoce por el presente, Yo/Nosotros hemos vendido, cedido y transferido todo el derecho y título para y de la mencionada invención y de la mencionada solicitud (s) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

Roche Glycart AG
Wagistrasse 18,
CH- 8952 Schlieren (Suiza)

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Ésta cesión es para pero no se limita a los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kasajstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur África, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EEUU, Venezuela.

Se requiere autenticación

(Ver firmas al dorso)

Por virtud de este traspaso el mencionado CESIONARIO está totalmente facultado para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios objetivos y cuenta la PATENTE DE INVENCIÓN en todo el mundo, especialmente en los países arriba indicados, y reivindicar para la misma el derecho de prioridad de la primera(s) solicitud (s) en los países arriba indicados (países) de acuerdo con las convenciones internacionales.

Firmado en Schlieren, Suiza

(Firmado), Thomas U. Hofer

(Firmado), Ralf Hosse

(Firmado), Ekkehard Moessner

(Firmado), Pablo Umaña

Gabriel Ricaurte Echeverri
Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Nosotros aceptamos este traspaso
Basilea, Suiza, a los 3 días de abril de 2012

Roche Glycart AG

Antonio Natoli (Firmado)
Firmante autorizado

Susanne Amann (Firmado)
Firmante autorizado

Certificación Oficial

Visto para autenticación de la anterior firma, declaración jurada, estampada en nuestra presencia por
+

El Sr. **Thomas Urs. HOFER**, nacido el 6 de junio de 1974, Ciudadano Suizo de Haldenstein GR, de acuerdo con la información de él con residencia en Alte Mühleackertrasse 50, 8046 Zúrich,
Identificado con tarjeta de identidad,

El Sr. Dr. **Ekkehard MÖSSNER**, nacido el 20 de abril de 1967, Nacionalidad: Alemana, de acuerdo con la información de él con residencia en Felsenburgweg 5, 8280 Kreuzlingen, identificado por permiso de residencia C.

Schlieren, 20 de diciembre de 2011
BK No. 2138-2139
Derechos CHF 40.00

Sello en Alemán

(Firmado)
Alfred Füllemann, Notario Público Delegado

Traductor Oficial
Res. 3987 del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Certificación Oficial

Visto para autenticación de la anterior firma, declaración jurada, estampada en nuestra presencia por

El Sr. Dr. **Ralf Jorg HOSSE**, nacido el 29 de junio de 1973, Nacionalidad: Alemana, de acuerdo con la información de él con residencia en Schmiedstrasse 8, 6330 Cham, identificado con tarjeta de identidad Alemana.

Schlieren, 20 de diciembre de 2011
BK No. 2138-2139
Derechos CHF 40.00

Sello en Alemán

Certificación Oficial

Visto para autenticación de la anterior firma, declaración jurada, estampada en nuestra presencia por

El Sr. **Pablo UMAÑA FERNANDEZ**, nacido el 23 de septiembre de 1967, Nacionalidad: Costarricense, de acuerdo con la información de él con residencia en Felsenrainstrasse 28, 8832 Wollerau,
Identificado con pasaporte.

Schlieren, 4 de agosto de 2011
BK No. 1214 + 1215
Derechos CHF 40.00

Sello en idioma alemán
Tobías von Arx, Notario Público Delegado

Traductor Oficial
del Ministerio de
Justicia de Agosto 17 de 1981

Para copia fiel:

Basilea (Suiza), a los 11 (once) días de mayo de 2013 (Dos Mil Trece).

(Firmado)

BV 3 (números ilegibles

APOSTILLA

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

1. País: Suiza

Este documento oficial

2. está firmado por **Dr. (nombre ilegible)**

Christoph Nertz

3. en la función de él /ella como **Notario Público**

4. y certificada por el sello del **arriba mencionado**

Certificado

5. En Basilea 6. el día 14 de Mayo de 2012

7. por la Cancillería del Estado del Cantón de Basilea- Stadt

8. No. 3540/6856

9. sello/estampilla: 10. Firma

(Firmado) Hanna Lauener

SELLO CON ESCUDO EN EL CENTRO DE LA CANCILLERÍA DEL ESTADO-CIUDAD DE BASILEA

= = =

Es traducción fiel y completa de un documento escrito en inglés del cual queda copia en esta oficina y a la cual me remito para su confrontación

For true photocopy

Assignment

I/WE, the undersigned

Thomas U. Hofer, research scientist, a Swiss citizen
Buhnrain 8
CH-8052 Zuerich, Switzerland

Ralf Hosse, research scientist, a German citizen
Schmiedstrasse 8
CH-6330 Cham, Switzerland

Ekkehard Moessner, research scientist, a German citizen
Felsenburgweg 5
CH-8280 Kreuzlingen, Switzerland

Pablo Umana, chief scientific officer, a Costa Rican citizen
Felsenrainstrasse 28
CH-8832 Wollerau, Switzerland

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

CEA Antibodies

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country	Filing date	Serial No.
27344 EP	02.03.2011	11156665.9

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

Roche Glycart AG
Wagistrasse 18,
CH-8952 Schlieren(Switzerland)

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

Notarization required
(signatures see reverse side)

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at Schlieren, Switzerland on

Thomas U. Hofer

Ralf Hosse

Ekkehard Moessner

Pablo Umana

We accept this assignment
Basle, Switzerland, this
3rd day of April, 2012

Roche Glycart AG

Antonio Natoli
Authorized signatory

Susanne Amann
Authorized signatory

Official Certification

Seen for authentication of the foregoing signatures, affixed in our presence by

Mr. **Thomas** Urs **HOFER**, born 6th June 1974, Swiss citizen of Haldenstein GR, according to his information residing at Alte Mühleackerstrasse 50, 8046 Zürich,
identified by identity card,

Mr. **Ekkehard MÖSSNER**, born 20th April 1967, Nationality: Germany, according to his information residing at Felsenburgweg 5, 8280 Kreuzlingen,
identified by residence permit C.

Schlieren, 20th December 2011
BK no. 2138-2139
Fee CHF 40.00

NOTARIAT SCHLIEREN

NOTARIAT SCHLIEREN Kt. Zürich

Alfred Füllemann, Deputy Notary Public

Official Certification

Seen for authentication of the foregoing signature, affixed in our presence by

Mr. **Ralf** Jörg **HOSSE**, born 29th June 1973, Nationality: Germany, according to his information residing at Schmiedstrasse 8, 6330 Cham,
identified by German identity card.

Schlieren, 21st December 2011
BK no. 2167
Fee CHF 20.00

NOTARIAT SCHLIEREN

NOTARIAT SCHLIEREN Kt. Zürich

Markus Schmid, Notariatsassistent

Official Certification

Seen for authentication of the reverse side signature, affixed in our presence by

Mr. **Pablo UMAÑA FERNANDEZ**, born 23rd September 1967, Nationality: Costa Rica, according to his information residing at Felsenrainstrasse 28, 8832 Wollerau, identified by passport.

Schlieren, 27th March 2012
BK no. 456
Fee CHF 20.00

NOTARIAT SCHLIEREN

Alfred Füllemann, Deputy Notary Public

For the photocopy:

B[illegible] s e l (Switzerland), this 11th (eleventh) day of May 2012 (two thousand and twelve).

BV 33[illegible]12

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by ... Dr. iur. ... Christoph Nertz ...
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 ... 14. Mai 2012 ...
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt ...
8. no. 3540/6816
9. Seal / stamp: 10. Signature:

Hanna Lauener

STATE CHANCERY * BASLE · CITY *