

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 244**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07758732 .7**  
96 Fecha de presentación: **16.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1996625**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **ANTICUERPOS ANTI-TAT226 E INMUNOCONJUGADOS.**

30 Prioridad:  
**17.03.2006 US 783746 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2012**

73 Titular/es:  
**GENENTECH, INC.**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:  
**LIANG, Wei-ching;**  
**SAKANAKA, Chie y**  
**WU, Yan**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 373 244 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-TAT226 e inmunoconjugados

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos anti-TAT226 e inmunoconjugados de los mismos. La invención se refiere además a métodos de utilización de anticuerpos anti-TAT226 e inmunoconjugados de los mismos.

## 10 ANTECEDENTES

[0002] Los anticuerpos que se unen a polipéptidos en la superficie de células cancerosas han demostrado que son terapias anticáncer efectivas. Dichos anticuerpos actúan a través de diversos mecanismos incluyendo, por ejemplo, la activación de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); inducción por el anticuerpo de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); aumento de la liberación de citoquinas; e inducción de apoptosis. Véase, por ejemplo, Cardarelli et al. (2002) *Cancer Immunol. Immunother.* 51:15-24. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado satisfactoriamente para tratar el cáncer de mama y el linfoma no de Hodgkin, respectivamente. HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2) humano. La sobreexpresión de la proteína HER2 se observa en el 35-30% de cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos. Ambos anticuerpos se producen recombinantemente en células CHO. HERCEPTIN® parece actuar, en parte, inhibiendo la angiogénesis (Izumi et al. (2002) *Nature* 416:279-280), y RITUXAN® parece actuar, al menos en parte, induciendo la apoptosis (Cardarelli et al. (2002) *Cancer Immunol. Immunother.* 51:15-24). EBI Accession No. GSP:AEG35724 describe un polipéptido de secuencia de consenso humano 01034/05915.

[0003] Los inmunoconjugados o "conjugados anticuerpo-fármaco" son útiles para la liberación local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer. Véase, por ejemplo, Syrigos et al. (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz et al. (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; patente de Estados Unidos No. 4,975,278. Los inmunoconjugados permiten la liberación dirigida de un grupo farmacológico a un tumor, mientras que una administración sistémica de agentes citotóxicos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad en células normales, así como en células tumorales que se desean eliminar. Véase, Baldwin et al. (Mar. 15, 1986) *Lancet* pp. 603-05; Torpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications* (A. Pinchera et al., eds.) pág. 475-506. Los inmunoconjugados que reconocen polipéptidos de la superficie celular se han desarrollado y continúan desarrollándose para el tratamiento del cáncer. Para una revisión, véase, por ejemplo, Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103.

[0004] Está claro que existe una continua necesidad de agentes que reconozcan polipéptidos de la superficie celular para fines de diagnóstico y/o terapéuticos. La invención descrita aquí cumple esta necesidad y proporciona otras ventajas.

## 45 DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0005] La presente invención proporciona anticuerpos anti-TAT226 tal como se define en las reivindicaciones.

[0006] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a TAT226, donde el anticuerpo es tal como se define en la reivindicación 1, reivindicación 2, o reivindicación 6.

[0007] En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anteriores comprende además por lo menos un armazón seleccionado entre un armazón de consenso del subgrupo III de VH y un armazón de consenso del subgrupo I de VL.

[0008] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a TAT226, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 22-25, y un dominio variable de cadena ligera que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:27-30, donde el anticuerpo tiene una  $K_D$  de  $\leq 10$ nM. En una realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:24 y un dominio variable de cadena ligera que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:29. En una realización, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:24, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:29. En una realización, el anticuerpo comprende a dominio variable de cadena pesada que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de

SEC ID NO:25, y un dominio variable de cadena ligera que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:30. En una realización, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:25, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:30.

5 [0009] El anticuerpo anterior es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')<sub>2</sub>. En una realización, el anticuerpo es humanizado. En una realización, el anticuerpo es humano.

10 [0010] La presente invención proporciona además inmunoconjugados tal como se define en las reivindicaciones.

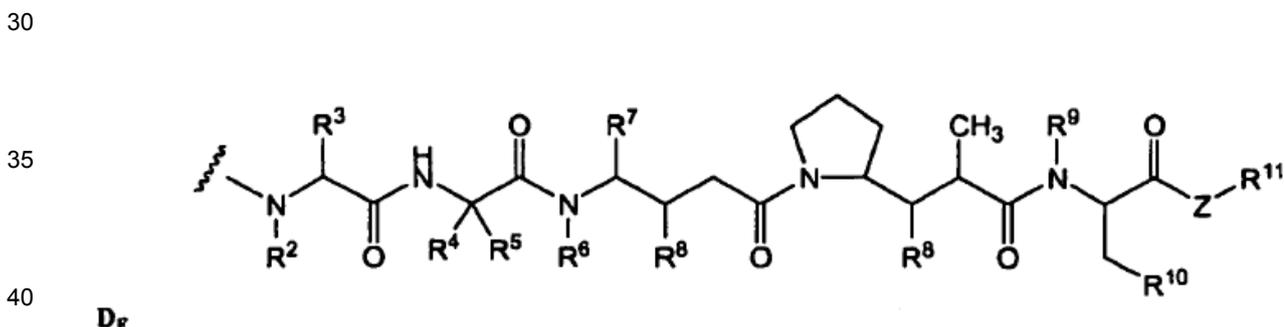
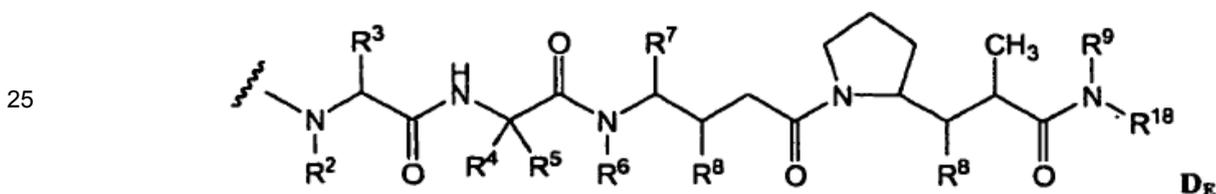
[0011] En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los anticuerpos anti-TAT226 de la invención unidos covalentemente a un agente citotóxico. En una realización, el agente citotóxico se selecciona entre una toxina, un agente quimioterapéutico, un anticuerpo, un isótopo radioactivo, y una enzima nucleolítica.

15 [0012] En un aspecto, se proporciona un inmunoconjugado que tiene la fórmula Ab-(L-D)<sub>p</sub>, donde:

(a) Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-TAT226, de la invención,

(b) L es un enlazador;

20 (c) D es un fármaco de fórmula D<sub>E</sub> o D<sub>F</sub>

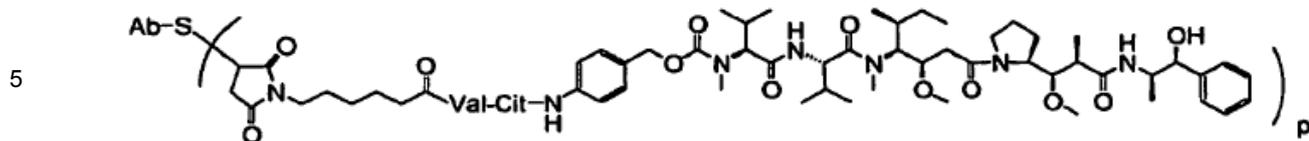


45 y donde R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OH, y H; R<sup>9</sup> es H; R<sup>10</sup> es arilo; Z es -O- o -NH-; R<sup>11</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>; y R<sup>18</sup> es -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo; y (d) p varía desde aproximadamente 1 a 8.

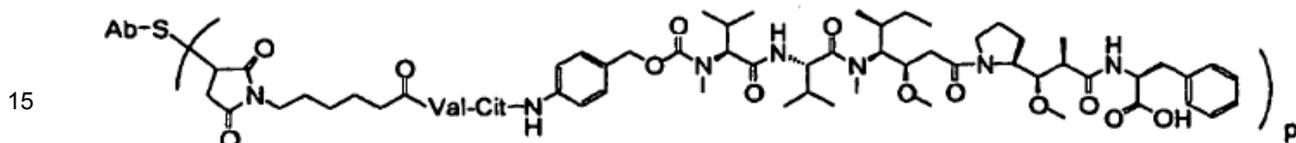
50 [0013] Las siguientes realizaciones se proporcionan además para cualquiera de los inmunoconjugados anteriores. En una realización, un inmunoconjugado tiene una actividad de citólisis in vitro o in vivo. En una realización, el enlazador está unido al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo. En una realización, el enlazador es separable por una proteasa. En una realización, el enlazador comprende un dipéptido val-cit. En una realización, el enlazador comprende una unidad de p-aminobencilo. En una realización, la unidad de p-aminobencilo se dispone entre el fármaco y un sitio de división por proteasa en el enlazador. En una realización, la unidad de p-aminobencilo es p-aminobenciloxycarbonilo (PAB). En una realización, el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo. En una realización, el 6-maleimidocaproilo se dispone entre el anticuerpo y un sitio separable por proteasa en el enlazador. Las realizaciones anteriores pueden tener lugar de forma individual o en cualquier combinación entre sí.

60 [0014] En una realización, el fármaco se selecciona entre MMAE y MMAF. En una realización, el inmunoconjugado tiene la fórmula

65



10 donde Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-TAT226 anteriores, S es un átomo de azufre, y p varía de 2 a 5. En una realización el inmunocnjugado tiene la fórmula



20 donde Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-TAT226 anteriores, S es un átomo de azufre, y p varía de 2 a 5.

25 **[0015]** En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los inmunocnjugados anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede utilizarse en un método de tratamiento de un trastorno proliferativo celular.

30 **[0016]** En una realización, el trastorno proliferativo celular se selecciona entre cáncer de ovario, cáncer uterino, tumor cerebral y tumor de Wilms. En una realización, el trastorno proliferativo celular está asociado con una expresión aumentada de TAT226 en la superficie de una célula.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **[0017]**

La figura 1 muestra la alineación de TAT226 de humano, mono cynomolgus ("cyno"), ratón y rata. Los residuos encuadrados son idénticos entre las especies. Los residuos restantes difieren entre por lo menos dos de las cuatro especies. El porcentaje de identidad de aminoácidos entre las secuencias de TAT226 de humano, mono cynomolgus, ratón y rata se muestra en la tabla bajo la alineación. El porcentaje de identidad se calculó utilizando el programa Clustal W.

40 La figura 2 muestra las secuencias de la región hipervariable de cadena pesada (HVR) H1, H2 y H3 de anticuerpos monoclonales anti-TAT226 designados como YWO.32 e YWO.49, tal como se describe en el ejemplo B. Las posiciones de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración Kabat descrito a continuación.

45 La figura 3 muestra las secuencias de HVR de cadena ligera L1, L2 y L3 de anticuerpos monoclonales anti-TAT226 designados como YWO.32 e YWO.49, tal como se describe en el ejemplo B. Las posiciones de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración Kabat descrito a continuación.

50 La figura 4 muestra las secuencias de HVR-HR y HVR-L3 de YWO.49 e YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, y YWO.49.H6, que se generaron por maduración para afinidad de YWO.49 utilizando bibliotecas de HVR-H3 y HVR-L3 aleatorizadas de forma suave, tal como se describe en el ejemplo B. También se muestran secuencias consenso HVR-H3 y HVR-L3.

55 Las figuras 5A y 5B muestran secuencias de armazón consenso de cadena pesada variable (VH) humanas aceptoras de ejemplo para utilizar en la práctica de la presente invención con los identificadores de secuencia siguientes:

- armazón de consenso de subgrupo I de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID NOs:32, 33, 34, 35).
- armazones de consenso de subgrupo I de VH humano "B," "C," y "D" menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOs:36, 37, 34,35; SEC ID NOs:36, 37, 38, 35; y SEC ID NOs:36, 37, 39, 35).
- armazón de consenso de subgrupo II de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID NOs:40, 41, 42, 35).
- 60 - armazones de consenso de subgrupo II de VH humano "B," "C," y "D" menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOs:43, 44, 42, 35; SEC ID NOs:43, 44, 45, 35; y SEC ID NOs:43, 44, 46, and 35).
- armazón de consenso de subgrupo III de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID NOs:47, 48, 49, 35).
- armazones de consenso de subgrupo III de VH humano "B," "C," y "D" menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOs:50, 51, 49, 35; SEC ID NOs:50, 51, 52, 35; y SEC ID NOs:50, 51, 53, 35).
- 65 - armazón aceptor de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID NOs:54, 48, 55, 35).
- armazones aceptores de VH humano "B" y "C" menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOs:50, 51, 55,

35; y SEC ID NOs:50, 51, 56, 35).

- armazón aceptor 2 de VH humano "A" menos CDR de Kabat (SEC ID NOs:54, 48, 57, 35).

- armazones aceptores 2 de VH humano "B," "C," y "D" menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOs:50, 51, 57, 35; SEC ID NOs:50, 51, 58, 35; y SEC ID NOs:50, 51, 59, 35).

5 Las figuras 6A y 6B muestran secuencias de armazón consenso de cadena ligera variable (VL) humanasceptoras de ejemplo para utilizar en la práctica de la presente invención con los identificadores de secuencia siguientes:

- armazón de consenso kappa de subgrupo I de VL humano ( $\kappa$ v1): SEC ID NOs:60, 61, 62, 63

10 - armazón de consenso kappa de subgrupo II de VL humano ( $\kappa$ v2): SEC ID NOs:64, 65, 66, 63

- armazón de consenso kappa de subgrupo III de VL humano ( $\kappa$ v3): SEC ID NOs:67, 68, 69, 63

- armazón de consenso kappa de subgrupo IV de VL humano ( $\kappa$ v4): SEC ID NOs:70, 71, 72, 63

15 La figura 7 muestra las secuencias de armazón de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de aminoácidos según Kabat.

La figura 8 muestra las secuencias de armazón de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8 con las modificaciones indicadas. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de aminoácidos según Kabat.

20 La figura 9 muestra las secuencias de la región variable de cadena pesada (VH) de YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6. Las HVRs están subrayadas.

25 La figura 10 muestra las secuencias de la región variable de cadena ligera (VL) de YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6. Las secuencias de VL del anticuerpo monoclonal humanizado 4D5-8 ("huMAb4D5-8") y un huMAb4D5-8 "modificado" también se muestran en las SEC ID NO:31 y SEC ID NO:26, respectivamente. YWO.32 e YWO.49 tienen la misma secuencia VK que la VL de huMAb4D5-8 "modificado" (SEC ID NO:26), que contiene las siguientes sustituciones en relación con la SEC ID NO:31: N30S, R66G, y H91S. Las HVRs están subrayadas.

30 La figura 11 muestra la alineación de las secuencias de la región variable de cadena pesada de YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6. Las HVR están encuadradas. Los residuos de las HVR-H3 de YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6 que difieren de los residuos correspondientes de la HVR-H3 de YWO.49 están sombreados.

35 La figura 12 muestra la alineación de las secuencias de la región variable de cadena ligera de YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6. Las HVR están encuadradas. Los residuos de las HVR-L3 de YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6 que difieren de los residuos correspondientes de la HVR-L3 de YWO.49 están sombreados.

40 La figura 13 muestra una representación gráfica de los niveles de la expresión génica de TAT226 humana en varios tejidos, tal como se describe en el ejemplo A.

45 La figura 14 muestra una representación gráfica de los niveles de la expresión génica de TAT226 humana en ovario normal; trompas (tubos) de Falopio normal; cáncer de ovario de los subtipos de célula clara, mucinoso y cistoadenocarcinoma seroso; cáncer de ovario metastático; y otros tipos de cáncer de ovario, tal como se describe en el ejemplo A.

50 La figura 15 muestra los resultados de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de células OVCAR3 en ausencia o presencia de los anticuerpos anti-TAT226 indicados, tal como se describe en el ejemplo D.

La figura 16 muestra el ARN y la expresión de proteína de TAT226 determinada por un ensayo de 5' nucleasa (TaqMan®) e inmunohistoquímica (IHC) realizados en células OVCAR3 y un panel de muestras de cáncer de ovario, tal como se describe en el ejemplo F.

55 La figura 17 muestra la actividad in vitro de varios conjugados fármaco-anticuerpo (ADC) de YWO.49.H2 e YWO.49.H6 en ensayo de citólisis celular de OVCAR3, tal como se describe en el ejemplo H.

60 La figura 18 muestra la actividad in vitro de varios ADC de YWO.49.H2 e YWO.49.H6 en un ensayo de citólisis celular utilizando transfectantes estables de HCT116#9-4, tal como se describe en el ejemplo H.

La figura 19 muestra la actividad in vivo de ADC de YWO.49.H6 utilizando xenoinjertos de ratón, tal como se describe en el ejemplo H.

65 La figura 20 muestra la actividad in vivo de ADC de YWO.49.H6 utilizando xenoinjertos de ratón derivados de paciente humano, tal como se describe en el ejemplo H.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCION

**[0018]** Se proporcionan anticuerpos aislados tal como se definen en las reivindicaciones que se unen a TAT226. También se proporcionan inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-TAT226 tal como se definen en las reivindicaciones. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con expresión alterada, por ejemplo, expresión incrementada, de TAT226. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno proliferativo celular, tal como un tumor o cáncer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para la detección de TAT226, por ejemplo, TAT226 expresado en la superficie celular.

**[0019]** Se proporciona polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-TAT226. Se proporciona vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-TAT226, se proporcionan células huésped que comprenden dichos vectores. También se proporcionan composiciones, incluyendo formulaciones farmacéuticas, que comprenden alguno o más de los polinucleótidos, anticuerpos anti-TAT226, o inmunoconjugados de la invención.

## I. TÉCNICAS GENERALES

**[0020]** Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados aquí son comprendidos en general y utilizados habitualmente utilizando una metodología convencional por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *Pcr 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

## II. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

## A. Definiciones

**[0021]** Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con usos de investigación, diagnóstico o terapéutico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, se purifica el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso de anticuerpo, determinado, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas realizaciones, en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

**[0022]** Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que está separada de por lo menos otra molécula de ácido nucleico con la que está asociada normalmente, por ejemplo, en su medio natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye además una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

**[0023]** "Purificado" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de por lo menos el 95% en peso, o por lo menos el 98% en peso de la muestra en que está contenida.

- 5 [0024] El término “sustancialmente similar” o “sustancialmente el mismo/la misma”, tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la presente invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significancia biológica y/o estadística escasa o nula en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, inferior a aproximadamente el 50%, inferior a aproximadamente el 40%, inferior a aproximadamente el 30%, inferior a aproximadamente el 20%, y/o inferior a aproximadamente el 10% en función del valor de referencia/comparación.
- 10 [0025] La frase “sustancialmente reducido/a” o “sustancialmente diferente”, tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significancia estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, superior a aproximadamente un 10%, superior a aproximadamente un 20%, superior a aproximadamente un 30%, superior a aproximadamente un 40%, y/o superior a aproximadamente un 50% en función del valor para la molécula de referencia/comparación.
- 15 [0026] El término “vector”, tal como se utiliza aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un ADN de doble cadena circular al que se pueden unir segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden unir segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero).
- 20 Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, de este modo, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren aquí como “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores recombinantes”). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, “plásmido” y “vector” se pueden utilizar indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada habitualmente.
- 25 [0027] “Polinucleótidos” o “ácido nucleico”, se utilizan indistintamente aquí, para referirse a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura de nucleótidos se puede realizar antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender modificaciones realizadas después de la síntesis, tal como mediante la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “caps”, sustitución de uno o más nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos, tales como, por ejemplo, aquellas con uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen grupos colgando, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, pli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, se puede sustituir cualquier grupo hidroxilo presente normalmente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos de bloqueo orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son conocidas generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acídicos y análogos de nucleósidos básicos, tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativa incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR<sup>2</sup> (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> (“formacetal”), en que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que opcionalmente contienen una unión éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos referidos aquí, incluyendo ARN y ADN.
- 30 [0028] “Oligonucleótido,” tal como se utiliza aquí, se refiere en general a polipéptidos cortos generalmente sintéticos y generalmente de una cadena que generalmente, pero no necesariamente, tienen una longitud inferior a

aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no se excluyen mutuamente. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

5 [0029] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia del polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de referencia, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

25 [0030] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para la comparación de secuencia de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$30 \quad 100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

40 [0031] El término “TAT226”, tal como se utilize aquí, se refiere a cualquier TAT226 nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término comprende TAT226 no procesado de “longitud completo”, así como cualquier forma de TAT226 que resulta del procesamiento en la célula. El término también comprende variantes naturales de TAT226, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Una “forma madura” de TAT226 es una forma de TAT226 que ha experimentado procesamiento, por ejemplo, una forma de TAT226 que ha sufrido una división N-terminal (por ejemplo, secuencia señal) y/o C-terminal y/o modificación mediante la unión de un anclaje a GPI. En una realización, una “forma madura” de TAT226 se expresa en la superficie celular.

50 [0032] Los “anticuerpos” (Abs) e “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen características estructurales similares. Aunque los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que en general carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y en niveles incrementados por mielomas.

55 [0033] Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se utilizan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (tal como se describe con más detalle aquí). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado para afinidad.

60 [0034] El término “anticuerpo anti-TAT226” o “un anticuerpo que se une a TAT226” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a TAT226 con suficiente afinidad que el anticuerpo es útil como agentes de diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de TAT226. Preferiblemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-TAT226 a una proteína no TAT226 no relacionada es inferior a aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a TAT226 medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a

TAT226 tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 10$  nM,  $\leq 1$  nM, o  $\leq 0,1$  nM. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 se une a un epítipo de TAT226 que se conserva entre TAT226 de diferentes especies.

5 **[0035]** La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede referir como "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede referir como "VL". Estos dominios son en general las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

10 **[0036]** El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) ambas en los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones armazón (FR). Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

20 **[0037]** Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

25 **[0038]** Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos (inmunoglobulinas) a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y descritas en general en, por ejemplo, Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos.

30 **[0039]** Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan aquí indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpos tal como se define a continuación. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

35 **[0040]** Los "Fragmentos de anticuerpos" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, donde la parte mantiene por lo menos una, y como máximo la mayoría o todas, las funciones asociadas normalmente con la parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, mantiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, mantiene por lo menos una de las funciones biológicas asociadas normalmente con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función ADCC y la unión a complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento.

40 **[0041]** La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab)<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación a antígeno idénticos y aún es capaz de reticularse a antígeno.

45 **[0042]** "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión a antígeno. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie Fv de cadena única (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un péptido enlazador flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una

Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0043] El fragmento Fab contiene dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C<sub>H1</sub>) de una cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C<sub>H1</sub> de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0044] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. En general, el polipéptido scFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

[0045] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) unido a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena de polipéptido (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993). Los triabodies y tetrabodies también se describen en Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

[0046] El término "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo de que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye habitualmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, donde la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana a partir de diversas secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de diversos clones, como un grupo de clones de hibridomas, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debería entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada puede además alterarse, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de esta invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige hacia un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que habitualmente no están contaminados por otras inmunoglobulinas.

[0047] El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere un procedimiento particular para su producción. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención, pueden obtenerse mediante un conjunto de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567), tecnologías de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 [1991]; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similar a humano en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patentes de Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks et al., *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0048] Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen específicamente anticuerpos

“quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)

**[0049]** Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón (“framework”) (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase 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). Véase también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en las mismas: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

**[0050]** Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se describe aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

**[0051]** El término “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se utiliza aquí, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis regiones hipervariables, y H3 en particular se cree que juega un papel único en conferir una especificidad muy precisa a los anticuerpos. Xu et al. (2000) *Immunity* 13:37-45; Johnson and Wu (2003) in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ). De hecho, los anticuerpos de camélidos naturales que consisten en una cadena pesada sólo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature* 363:446-448; Sheriff et al. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736.

**[0052]** Se utiliza un conjunto de delineaciones de la región hipervariable y se comprenden en la presente invención. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más utilizadas habitualmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelaje del anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables “de contacto” se basan en el análisis de estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (numeración Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (numeración Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

**[0053]** Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” tal como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 ó 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se enumeran según Kabat et al., supra

para cada una de estas definiciones.

**[0054]** Residuos de "Armazón" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen aquí.

**[0055]** El término "residuo de dominio variable que se enumera como en Kabat" o "posición de aminoácido que se enumera como en Kabat", y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondiente a un recorte o una inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de residuos Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia enumerada Kabat "estándar".

**[0056]** Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que da lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta o estas alteraciones. Len una realización, un anticuerpo madurado para afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración para afinidad mediante el desplazamiento de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de HVR y/o armazón se describe en: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

**[0057]** Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

**[0058]** Un "anticuerpo agonista", tal como se utiliza aquí, es un anticuerpo que mimetiza por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

**[0059]** Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C<sub>1</sub>q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y la activación de células B.

**[0060]** Los términos "receptor Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas ("spliced") de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (TTAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase en Daéron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término "FcR" aquí.

**[0061]** El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587 y Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen procedimientos para medir la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de los polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humana pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o en líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se han administrado polipéptidos variantes de Fc.

**[0062]** En el documento WO00/42072 (Presta) se describen las variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a los FcR. El contenido de la publicación de patente se incorpora específicamente en la presente por referencia. Véase también Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

**[0063]** "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función o funciones efectoras de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

**[0064]** "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig se unía a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células citotóxicas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permitiendo que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora del antígeno y posteriormente maten la célula diana con citotoxinas. Las células principales para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de Estados Unidos. N° 5.500.362 o 5.821.337, o en la patente de Estados Unidos. de Presta N°. 6.737.056. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

**[0065]** "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C<sub>1</sub>q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afin. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

**[0066]** Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y una capacidad de unión a C<sub>1</sub>q aumentada o disminuida se describen en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1 y en el documento WO99/51642. Los contenidos de estas publicaciones de patentes se incorporan específicamente en la presente por referencia. Véase también, Idusogie et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

**[0067]** El término "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmuno adhesina, que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante técnicas de modificación recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

**[0068]** Un "armazón humano aceptor" para los objetivos de la presente invención es un armazón (framework) que comprende la secuencia de aminoácidos de un armazón VL o VH derivado de un armazón de inmunoglobulina humana, o de un armazón de consenso humano. Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o armazón de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Cuando los cambios preexistentes de aminoácidos están presentes en una VH, preferiblemente estos cambios son sólo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el armazón humano aceptor de VL es idéntico en la secuencia con la secuencia del armazón de inmunoglobulina humana VL o una secuencia de armazón de consenso humana.

**[0069]** Un "armazón de consenso humano" es un armazón que representa el residuo de aminoácido más habitual en una selección de secuencias armazón VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, para la VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al, supra. En una realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al., supra.

**[0070]** Un "armazón de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de la cadena pesada variable de Kabat et al., supra. En una realización, la secuencia de aminoácidos del armazón de consenso del subgrupo III de VH comprende por lo menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO:50)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEC ID NO:51)-H2-RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID NO:59)-H3-WGQGTLVTVSS (SEC ID NO:35).

**[0071]** Un "armazón de consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las

secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa de la cadena ligera variable de Kabat et al., supra. En una realización, la secuencia de aminoácidos del armazón de consenso del subgrupo I de VH comprende por lo menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO:60)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO:61)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLT1SSLQPEDFATYYC (SEC ID NO:62)-L3-FGQGTKVEIK (SEC ID NO:63).

**[0072]** "Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de la pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad de puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos aquí. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general a antígenos lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que anticuerpos de afinidad elevada se unen en general a antígenos más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos de medición de la afinidad de unión y cualquiera se puede utilizar para los objetivos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

**[0073]** En una realización, "Kd" o "el valor Kd" según la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con una versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fabs por el antígeno mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, a continuación se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de [<sup>125</sup>I]-antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistentes con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incuba a continuación durante toda la noche; aunque sin embargo la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que produce menos o igual a un 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

**[0074]** Según otra realización, Kd o el valor de Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k<sub>on</sub>) y velocidades de disociación (k<sub>off</sub>) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad "on" supera 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup> mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

**[0075]** Una "velocidad on" o "velocidad de asociación o "k<sub>on</sub>" según la presente invención también se puede determinar tal como se ha descrito anteriormente utilizando un sistema BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)

**[0076]** Un "trastorno" es cualquier condición o enfermedad que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la presente invención. Esto incluye trastornos crónicos y agudos incluyendo aquellas condiciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de

trastornos a tratar en la presente invención incluyen patologías cancerosas, tales como tumores; carcinomas (tumores epiteliales) y blastomas (tumores derivados de tejido embrionario), y en algunas realizaciones, cáncer de ovario, cáncer uterino (incluyendo cáncer de endometrio), tumores de cerebro (por ejemplo, astrocitomas y gliomas), y cáncer de riñón, incluyendo nefroblastomas (por ejemplo, tumor de Wilms).

5 **[0077]** Los términos “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

10 **[0078]** “Tumor”, tal como se utiliza aquí, se refiere al crecimiento y proliferación de todas las células neoplásicas, tanto malignas como benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo celular” y “tumor” no se excluyen mutuamente tal como se refieren aquí.

15 **[0079]** Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento/proliferación celular no regulada. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin), blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hematoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

25 **[0080]** Tal como se utiliza aquí, “tratamiento” (y variaciones tales como “tratar” o “tratamiento”) se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar la evolución natural del individuo o la célula en tratamiento, y se puede realizar por profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o cura parcial del estado patológico y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se utilizan los anticuerpos de la presente invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno.

35 **[0081]** Un “individuo” es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, pero sin limitaciones, animales de granja (como vacas), animales de competición, mascotas (como gatos, perros o caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, el mamífero es un humano.

40 **[0082]** Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

45 **[0083]** Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz sería menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

50 **[0084]** El término “agente citotóxico” tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función celular y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo,  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

60 **[0085]** Una “toxina” es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

65 **[0086]** Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes tales como la tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; los alquilsulfonatos tales como el busulfán, el improsulfán y el pipsulfán; las aziridinas tales como la benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluyendo la altretamina,

trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolmelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la briostatina; la calistatina; el CDC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofílico; teniposide; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; las mostazas nitrogenadas tales como el clorambucilo, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el hidrocloreto del óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitrosureas tales como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina, y la ranimustina; los antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gammall y la caliqueamicina omegall (véase, por ejemplo, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo de la neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicinas, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamicina®) (incluyendo la morfolino-doxorubicina, la cianomorfolino-doxorubicina, la 2-pirrolino-doxorubicina y la desoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas tales como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puomicina, la quelamicina, la rodorubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la zinostatina, la zorubicina; los anti-metabolitos tales como el metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico tales como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina tales como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiampirina, la tioguanina; los análogos de pirimidina tales como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxiluridina, la encitabina, la floxuridina; los andrógenos tales como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestanol, la mepitioestana, la testolactona; los anti-adrenales tales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; los rellenos de ácido fólico tales como el ácido frolínico; la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfomitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiurea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides tales como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentostatina; el fenameto; la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazona; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); la razoxana; la rizoxina; el sizofirano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquna; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINA®, FILDESINA®); la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromano; la gacitósina; el arabinósido ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación en nanopartículas de paclitaxel diseñado en albúmina, libre de Cremóforos ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y el doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); el cloranbucilo; la gemcitabina (Gemzar®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los análogos de platino tales como el cisplatino y carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; la vinorelbina (Navelbine®); la novantrona; el edatraxato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides tales como el ácido retinoico; la capecitabina (XELODA®); y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviación para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviación para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

**[0087]** También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden inducir el crecimiento del cáncer y, a menudo, en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser hormonas en sí. Entre los ejemplos se incluyen antiestrógenos y modulares de receptores de estrógeno selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), EVTSTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; anti-progesteronas; subreguladores del receptor de estrógeno (ERDs); agentes que actúan para suprimir o desactivar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), tales como LUPRON® y acetato de leuprolide ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato ARELIA®, tiludronato SKELID®, o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo del 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en mecanismos de señalización implicados en la proliferación celular

aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas con terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAPID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

**[0088]** Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa TAT, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan TAT en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis en células.

**[0089]** El término "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto resultante de un proceso o reacción metabólica en una célula en un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). El proceso o reacción metabólica puede ser un proceso enzimático, tal como la división proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, o la hidrólisis de un grupo funcional, tal como una hidrazina, éster o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado división intracelular después de la entrada, difusión, captación o transporte en una célula.

**[0090]** Los términos "divididos intracelularmente" y "division intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólica en una célula en un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), por el cual se rompe la unión covalentemente, es decir, un enlazador, entre el grupo farmacológico (D) y el anticuerpo (Ab), dando lugar a un fármaco libre disociado del anticuerpo dentro de la célula. Los grupos divididos del ADC son por tanto metabolitos intracelulares.

**[0091]** El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad determinada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (velocidad) como la cantidad total (grado) del fármaco que alcanza la circulación general a partir de una forma de dosificación administrada.

**[0092]** El término "actividad citotóxica" se refiere a un efecto inhibidor de la histólisis, citostático o del crecimiento de un conjugado anticuerpo-fármaco o un metabolito intracelular de un conjugado anticuerpo-fármaco. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor IC50 que es la concentración (molar o en masa) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de células.

**[0093]** "Alquilo" es un hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Ejemplos son metilo (Me, -CH<sub>3</sub>), etilo (Et, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-pentilo (n-pentilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-hexilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-hexilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-hexilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-3-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**[0094]** El término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>," tal como se utiliza aquí se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" representativos incluyen, pero sin limitación, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> ramificados incluyen, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -tert-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> insaturados incluyen, pero sin limitación, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tertbutilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo,

2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, n-heptilo, isoheptilo, n-octilo, e isoctilo. Un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>-NHC(O)R', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

[0095] "Alqueniilo" es un hidrocarburo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con por lo menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono sp<sup>2</sup>. Ejemplos incluyen, pero sin limitación: etileno o vinilo (-CH=CH<sub>2</sub>), alilo (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), ciclopentenilo (-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>), y 5-hexeniilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>)

[0096] "Alquinilo" es un hidrocarburo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con por lo menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono sp. Ejemplos incluyen, pero sin limitación: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH<sub>2</sub>C≡CH),

[0097] "Alquileo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada o cíclico, saturado, de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono iguales o diferentes de un alcano parental. Los radicales alquileo habituales incluyen, pero sin limitación: metileno (-CH<sub>2</sub>-), 1,2-etilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-propilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), y similares.

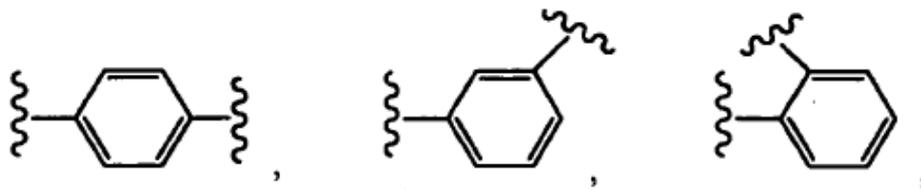
[0098] Un "alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>" es un grupo hidrocarburo de cadena lineal saturado de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>. Ejemplos de alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

[0099] "Alquenileno" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal, ramificada o cíclico insaturado de 2-18 átomos de carbono y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono iguales o diferentes de un alqueno parental. Los radicales alquenileno habituales incluyen, pero sin limitación: 1,2-etileno (-CH=CH-).

[0100] "Alquinileno" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada o cíclico insaturado de 2-18 átomos de carbono y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono iguales o diferentes de un alquino parental. Los radicales alquinileno habituales incluyen, pero sin limitación: acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH<sub>2</sub>C≡C-), y 4-pentileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C-).

[0101] "Arilo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y antraceniilo. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

[0102] Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones orto, meta o para mostradas en las siguientes estructuras:



en que el grupo fenilo puede estar no sustituido o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

[0103] "Arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, habitualmente un átomo de carbono terminal o sp<sup>3</sup>, está sustituido por un radical arilo. Grupos arilalquilo habituales incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. El grupo arilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo el grupo alquilo, incluyendo grupos alcanoilo, alqueniilo o alquinilo, del grupo arilalquilo de 1 a 6 átomos de carbono y el grupo arilo de 5 a 14 átomos de carbono.

**[0104]** "Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, habitualmente un átomo de carbono terminal o  $sp^3$ , está sustituido por un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo habituales incluyen, pero sin limitación, 2-benzimidazolilmetilo, 2-furiletilo, y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el grupo alquilo, incluyendo grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo de 1 a 6 átomos de carbono y el grupo heteroarilo de 5 a 14 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S. El grupo heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

**[0105]** "Alquilo sustituido," "arilo sustituido," y "arilalquilo sustituido" significan alquilo, arilo y arilalquilo, respectivamente, en que uno o más átomos de hidrógeno se sustituyen cada uno independientemente con un sustituyente. Los sustituyentes habituales incluyen, pero sin limitación, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S-,  $-NR^2$ ,  $-NR^3$ , =NR,  $-CX_3$ , -CN, -OCN, -SCN,  $-N=C=O$ , -NHS, -NO,  $-NO_2$ ,  $=N_2$ ,  $-N_3$ ,  $NC(=O)R$ ,  $-C(=O)R$ ,  $-C(=O)NR^2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-SO_3H$ ,  $S(=O)_2R$ ,  $-OS(=O)_2OR$ ,  $-S(=O)_2NR$ ,  $-S(=O)R$ ,  $-OP(=O)(OR)_2$ ,  $-P(=O)(OR)_2$ ,  $-PO_3^-$ ,  $-PO_3H_2$ ,  $-C(=O)R$ ,  $-C(=O)X$ ,  $-C(=S)R$ ,  $-CO_2R$ ,  $-CO_2^-$ ,  $-C(=S)OR$ ,  $-C(=O)SR$ ,  $-C(=S)SR$ ,  $-C(=O)NR^2$ ,  $-C(=S)NR^2$ ,  $-C(=NR)NR^2$ , donde cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br, o I; y cada R es independientemente -H, alquilo  $C_2-C_{18}$ , arilo  $C_6-C_{20}$ , heterociclo  $C_3-C_{14}$ , grupo protector o grupo profármaco. Los grupos alquileno, alquenileno y alquinileno tal como se describen anteriormente también se pueden sustituir de forma similar.

**[0106]** "Heteroarilo" y "heterociclo" se refieren a un sistema anular en que uno o más átomos de anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros de anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

**[0107]** Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 hasta ahora), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19, and 28; and J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

**[0108]** Ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo), quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo,  $\beta$ -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, finazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolínulo, e isatinoilo.

**[0109]** A modo de ejemplo y sin limitación, los heterociclos unidos por carbono se unen en las posiciones 2, 3, 4, 5, ó 6 de una piridina, las posiciones 3, 4, 5, ó 6 de una piridazina, las posiciones 2, 4, 5, ó 6 de una pirimidina, posiciones 2, 3, 5, ó 6 de una pirazina, las posiciones 2, 3, 4, ó 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, las posiciones 2, 4, ó 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, las posiciones 3, 4, ó 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, las posiciones 2 ó 3 de una aziridina, las posiciones 2, 3, ó 4 de una azetidina, las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una quinolina o las posiciones 1, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una isoquinolina. Aún más habitualmente, los heterociclos unidos por carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, o 5-tiazolilo.

**[0110]** A modo de ejemplo y sin limitación, los heterociclos unidos por nitrógeno se unen en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, la posición 2 de un isoindol, o isoindolina, la posición 4 de una morfolina, y la posición 9 de un carbazol, o  $\beta$ -carbolina. Aún más habitualmente, heterociclos unidos por nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, y 1-piperidinilo.

**[0111]** Un "heterociclo  $C_3-C_8$ " se refiere a un carbociclo  $C_3-C_8$  aromático o no aromático en que de uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo se sustituyen independientemente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Ejemplos representativos de un heterociclo  $C_3-C_8$  incluyen, pero sin limitación, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, coumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo,

triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar no sustituido o sustituido con hasta siete grupo que incluyen, pero sin limitación, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

[0112] "Heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> definido anteriormente donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo está sustituido por un enlace. Un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar no sustituido o sustituido con hasta seis grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alquilo, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

[0113] "Carbociclo" significa un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos de anillo, aún más habitualmente 5 ó 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o 9 ó 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo, y ciclooctilo.

[0114] Un "carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" es un anillo carbocíclico no aromático saturado o insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros. Los carbociclos C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> representativos incluyen, pero sin limitación, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo, y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halogen, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

[0115] Un "carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> definido anteriormente donde uno de los átomos de hidrógeno de los grupos carbociclo está sustituido por un enlace.

[0116] "Enlazador" se refiere a un grupo químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un grupo farmacológico. En varias realizaciones, los enlazadores incluyen un radical bivalente, tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, grupos tales como: -(CR<sup>2</sup>)<sub>n</sub>O(CR<sup>2</sup>)<sub>n</sub>-, unidades repetitivas de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo polietilenoamino, Jeffamine™); y éster y amidas de diácido incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

[0117] El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse con su imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se superponen con su imagen especular.

[0118] El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

[0119] "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imagen especular entre sí. Los diastereómeros presentan propiedades físicas diferentes, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividad. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar bajo procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

[0120] "Enantiómeros" se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

[0121] Las definiciones y convenciones esereoquímicas utilizadas en la presente invención siguen en general S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, presentan la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada por el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se utilizan para indicar la configuración absoluta de la molécula sobre su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se utilizan para designar el signo de rotación de luz polarizada por el plano por el compuesto, con (-) o l significando que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química determinada, estos estereoisómeros son idénticos a excepción de que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede referir como un enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se denomina a menudo como una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se refiere como una mezcla racémica o un racemato, que puede tener lugar cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

**[0122]** "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que se puede sustituir por otro grupo funcional. Ciertos grupos salientes son bien conocidos en la técnica y ejemplos incluyen, pero sin limitación, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), y trifluorometilsulfonato.

5

#### B. Abreviaturas

#### COMPONENTES ENLAZADORES:

10 **[0123]**

MC = 6-maleimidocaproilo

Val-Cit o "vc" = valina-citrulina (un dipéptido de ejemplo en un enlazador divisible por proteasa)

Citrulina = ácido 2-amino-5-ureido pentanoico

PAB = p-aminobenciloicarbonyl (un ejemplo de un componente enlazador "auto inmolativo")

15 Me-Val-Cit = N-metil-valina-citrulina (donde el enlace peptídico del enlazador ha sido modificado para evitar su división por la catepsina B)

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproilo- polietilenglicol (se puede unir a cisteínas de anticuerpo).

#### FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

20

**[0124]**

MMAE = mono-metil auristatina E (MW 718)

MMAF = variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C-terminal del fármaco (PM 731,5)

25 MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en una unión amida en la fenilalanina C-terminal (PM 801,5)

MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado en la fenilalanina

MMAF-NtBu = N-t-butilo, unido como una amida en C-terminal de MMAF

**[0125]** Más abreviaturas son las siguientes: AE es auristatina E, Boc es N-(t-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEAR es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es N,N-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es N,N-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilanunopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas por electrospray, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida a presión elevada, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1S,2R)-(+)-norefedrina, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo tris-pirrolidino fosfonio, SEC es cromatografía por exclusión de tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta, y val es valina.

45 **III. COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA SU FABRICACIÓN**

**[0126]** Se proporcionan anticuerpos que se unen a TAT226 tal como se definen en las reivindicaciones. Se proporcionan inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-TAT226 tal como se definen en las reivindicaciones. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos relacionados con la expresión alterada, por ejemplo, expresión aumentada de TAT226. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer.

55 **A. Anticuerpos anti-TAT226**

**[0127]** TAT226 ("Diana Antigenica asociada a Tumor no. 226") es una proteína que se procesa y expresa en la superficie de ciertos tipos de células, incluyendo células tumorales. En particular, TAT336 humano se ha descrito previamente que sobreexpresa en ciertos tipos de tumores, incluyendo tumores de ovario, útero, endometrio, riñón, pulmón, páncreas, adrenal y hepatocelular. Véase, por ejemplo, las publicaciones de las solicitudes de patentes de Estados Unidos Nos. US 2003/0148408 A1, US 2004/0229277 A1, y US 2003/0100712 A1 (que se refieren a TAT226 como "PRO9917"); y la Patente de Estados Unidos No. 6,710,170 B2 (SEC ID NO:215). Otras entradas de las bases de datos y memorias relacionadas con TAT226 son las siguientes: NCBI no. de acceso AY358628\_1 (que se refieren a TAT226 humano como "PSCA Hlog"); NCBI no. de acceso AAQ88991.1 y "gi" no. 37182378 (que se refieren a TAT226 humano como "PSCA Hlog"); RIKEN cDNA 2700050C12; US 2003/0096961 A1 (SEC ID NO:16); US 2003/0129192 A1 (SEC ID NO:215); US 2003/0206918 A1 (Ejemplo 5; SEC ID NO:215); US 2003/0232056 A1 (SEC ID NO:215); US 2004/0044179 A1 (SEC ID NO:16); US 2004/0044180 A1 (SEC ID NO:16); US 2005/0238649

65

A1 (que se refieren a TAT226 humano como "PSCA Hlog"); WO 2003/025148 (SEC ID NO:292); WO 2003/105758 (SEC ID NO:14); y EP 1347046 (SEC ID NO: 2640).

5 **[0128]** TAT226 de longitud completa se somete a procesamiento en la célula para generar una forma madura de la proteína que se expresa en la superficie celular. Por ejemplo, un TAT226 humano de longitud completa tal como se muestra en SEC ID NO:75 contiene un péptido señal predicho de aminoácidos 1-20 ó 1-22, que se prevé que se separa de la proteína, el extremo C-terminal de los aminoácidos 116-141 se prevé que se separa de la proteína y un grupo GPI se une a la proteína en el aminoácido 115. Una forma madura de TAT226 humano, de los aminoácidos 21-115 o 23-115 de SEC ID NO:75, se prevé que se anclan a la superficie celular a través del grupo de GPI. TAT226 de mono y roedor (véase, por ejemplo, SEC ID NOs:76-78) son muy similar a TAT226 humano y de este modo se separan y modifican en las posiciones de aminoácidos equivalentes. Véase la figura 1. Las formas maduras resultantes de TAT226 humano, de mono o resultante de los aminoácidos 21-115 o 23-115 (tal como se muestra en la figura 1) son idénticas en un 100%.

15 **[0129]** Otras características de TAT226 humano incluyen un sitio de N-glicosilación predicho en el aminoácido 45, que se confirmó empíricamente, y un dominio Ly6/u-PAR predicho de los aminoácidos 94-107 de SEC ID No: 75. TAT226 humano tiene aproximadamente una homología de aminoácidos del 32% con el antígeno de células madre de próstata (PSCA), un antígeno de tumor específico de cáncer de próstata que se expresa en la superficie celular a través de la unión de GPI. Véase, Reiter et al. (1998) Proc. Nat 'l. Acad. Sci. USA 95:1735-1740. El PSCA se sobreexpresa en más del 80% de los cánceres de próstata. Id. Como TAT226, contiene un dominio de Ly6/u-PAR predicho, que está implicado en funciones celulares, tales como la transducción de señales y adhesión celular. Id.

25 **[0130]** En un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos tal como se define en las reivindicaciones que se unen a TAT226. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a una forma madura de TAT226. En una de dichas realizaciones, una forma madura de TAT226 tiene una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 21-115 o 23-115 de SEC ID NO:75. En algunas realizaciones, un anticuerpo para TAT226 se une a una forma Madura de TAT226 expresada en la superficie celular. En algunas realizaciones, un anticuerpo que se une a una forma madura de TAT226 expresada en la superficie celular inhibe el crecimiento de una célula. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 se une a una forma Madura de TAT226 expresada en la superficie celular e inhibe la proliferación celular. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 se une a una forma madura de TAT226 expresada en la superficie celular e induce la muerte celular. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 se une a una forma madura de TAT226 expresada en la superficie de células cancerosas. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 se une a una forma madura de TAT226 que se sobreexpresa en la superficie de células cancerosas en relación a células normales del mismo origen de tejido.

35 **[0131]** El anticuerpo anti-TT226 de la invención es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, un anticuerpo anti-TAT226 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')<sub>2</sub>. En un aspecto, un anticuerpo anti-TAT226 es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos anti-TAT226 descritos aquí se purifican.

40 **[0132]** En la presente se proporcionan anticuerpos monoclonales de ejemplo derivados de una biblioteca de fagos tal como se describe en el ejemplo B. El antígeno utilizado para cribar la biblioteca fue un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos 1-115 de SEC ID NO:75, correspondiente a una forma de TAT226 que carece de los aminoácidos que son C-terminales del posible sitio de unión a GPI. Los anticuerpos resultantes del cribado de la biblioteca se designan como YWO.32 y YWO.49. YWO.49 se maduró para afinidad para generar YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6. Las alineaciones de las secuencias de los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, e YWO.49.H6 se muestran en las figuras 11 y 12, respectivamente.

50 **[0133]** Se proporcionan anticuerpos monoclonales que compiten con YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, o YWO.49.H6 para la unión a TAT226. Se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo que YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, o YWO.49.H6.

55 **[0134]** Se describen aquí polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-TAT226. Se describen aquí vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-TAT226. Se describen células huésped que comprenden dichos vectores. Se describen composiciones que comprenden los anticuerpos anti-TAT226 o polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-TAT226. En ciertas realizaciones, una composición de la invención es una formulación farmacéutica tal como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, tal como los indicados aquí.

60 **[0135]** Una descripción detallada de anticuerpos anti-TAT226 de ejemplo es la siguiente:

1. Realizaciones específicas de anticuerpos anti-TAT226

65 **[0136]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo tal como se define en las reivindicaciones.

**[0137]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-TAT226 que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 5; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:9; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:17.

**[0138]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-TAT226 que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 5; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:10; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:18.

**[0139]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 se madura para afinidad para obtener la afinidad de unión a la diana deseada. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos de un anticuerpo se sustituyen en las siguientes posiciones de HVR (numeración Kabat) H98, H99, H100, H100B, L90, L92, L93, L96, y L97. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden realizar una o más de las siguientes sustituciones en cualquier combinación:

- en HVR-H3 (SEC ID NO:6): V98I; S99T; R100L o I; G100bA, S, o P
- en HVR-L3 (SEC ID NO:14): Q90R, K, H, o N; Y92V; T93F, N, G, o A; P96F; T97I o A

Todas las posibles combinaciones de las sustituciones anteriores están comprendidas por las secuencias consenso de SEC ID NO:11 (HVR-H3) y SEC ID NO:19 (HVR-L3).

**[0140]** Un anticuerpo anti-TAT226 puede comprender cualquier secuencia armazón de dominio variable, siempre que el anticuerpo mantenga la capacidad de unirse a TAT226. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TAT226 de la presente invención comprenden una secuencia de consenso de armazón de cadena pesada de subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón de cadena pesada comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones 71, 73 y/o 78. En una realización de estos anticuerpos, la posición 71 es A, la posición 73 es T, y/o la posición 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden una secuencia de armazón de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8, por ejemplo, SEC ID NO:50, 51, 59, 35 (FR1, 2, 3, 4, respectivamente). huMAb4D5-8 se conoce comercialmente como HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA; también se refieren en las patentes de Estados Unidos Nos. 6,407,213 & 5,821,337, y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93. En una de dichas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kl humana. En una de dichas realizaciones, estos anticuerpos comprenden una secuencia armazón de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8.

**[0141]** En una realización, un anticuerpo anti-TAT226 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de armazón y regiones hipervariables, donde la secuencia de armazón comprende las secuencias FR1-FR4 seleccionadas de las mostradas en las figuras 5A y 5B; la HVR H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4; la HVRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5; y la HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:6-11. En una realización de estos anticuerpos, la HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:9 ó 10. En una realización, un anticuerpo anti-TAT226 comprende a dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia armazón y regiones hipervariables, donde la secuencia armazón comprende las secuencias FR1-FR4 seleccionadas entre las mostradas en las figuras 6A y 6B; la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12; la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y la HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:14-19. En una realización de estos anticuerpos, la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:17 ó 18.

**[0142]** En una realización, un anticuerpo anti-TAT226 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia armazón y regiones hipervariables, donde la secuencia armazón comprende las secuencias FR1-FR4 de SEC ID NO:50, 51, 59, y 35, tal como se muestran en la figura 7; la HVR H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4; la HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5; y la HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:6-11. En una realización de estos anticuerpos, la HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:9 ó 10. En una realización, un anticuerpo anti-TAT226 comprende a dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia armazón y regiones hipervariables, donde la secuencia armazón comprende las secuencias FR1-FR4 de SEC ID NO:60, 61, 62, y 63, tal como se muestran en las figuras 6A y 6B; la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12; la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y la HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:14-19. En una realización de estos anticuerpos, la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:17 ó 18.

**[0143]** En una realización, un anticuerpo anti-TAT226 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia armazón y regiones hipervariables, donde la secuencia armazón comprende las

secuencias FR1-FR4 de SEC ID NO:50, 51, 53, y 35, tal como se muestran en la figura 8; la HVR H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4; la HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5; y la HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:6-11. En una realización de estos anticuerpos, la HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:9 ó 10. En una realización, un anticuerpo anti-TAT226 comprende a dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia armazón y regiones hipervariables, donde la secuencia armazón comprende las secuencias FR1-FR<sup>4</sup> de SEC ID NO:60, 61, 62, y 74, tal como se muestran en la figura 8; la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12; la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y la HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:14-19. En una realización de estos anticuerpos, la HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:17 ó 18.

**[0144]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TAT226 tal como se define en las reivindicaciones que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:22-25. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia contiene sustituciones, inserciones o deleciones en relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácido mantiene la capacidad de unirse a TAT226. En algunas realizaciones, se han sustituido, insertado o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia seleccionada entre SEC ID NO:22-25. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:22-25.

**[0145]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TAT226 que comprende un dominio variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 4D5 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también referido en la patente de Estados Unidos No. 6,407,213 y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93) representado en la SEC ID NO: 31 siguiente.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
 30 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln  
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly  
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Tbr Pro Pro  
 35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108 (SEC ID NO:31) (los residuos de HVR están subrayados)

**[0146]** En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 está modificada en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg e His indicados arriba en negrita/cursiva, respectivamente). En una realización, la secuencia de huMAb4D5-8 modificada comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. Por consiguiente, en una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia representada en la SEC ID NO:26 siguiente:

**I Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val**  
**Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln**  
**Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Va**  
**Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser *Gly* Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu**  
**Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr**  
**Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108 (SEQ ID NO:26)**

(Los residuos de HVR están subrayados)

Los residuos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 se indican arriba en negrita/cursiva.

**[0147]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TAT226 tal como se define en las reivindicaciones que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:27-30. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia contiene sustituciones, adiciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos mantiene la capacidad de unirse a TAT226. En algunas realizaciones, se han sustituido, insertado o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia seleccionada entre SEC ID

NO:27-30. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:27-30.

- 5 **[0148]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TAT226 tal como se define en las reivindicaciones que comprende (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:22-25; y (b) un dominio variable de cadena ligera que  
10 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95% 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:27-30. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia contiene sustituciones, adiciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos mantiene la capacidad de unirse a TAT226. En algunas realizaciones, se han sustituido, insertado o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de referencia. En algunas  
15 realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:22-25 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:27-30.
- 20 **[0149]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:24 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TAT226 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:25 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:30.

## 25 2. Fragmentos de anticuerpos

**[0150]** La presente invención comprende fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas  
30 circunstancias, existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpos, en lugar de los anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al. (2003) Nat. Med 9:129-134.

35 **[0151]** Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden todos expresar en y secretarse de *E. Coli*, permitiendo así  
40 la producción simple de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(Ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con una mayor vida media  
45 in vivo que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor salvaje se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos carentes de regiones constantes; de este modo, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión con sFv se pueden  
50 construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

## 55 3. Anticuerpos humanizados

**[0152]** La presente invención comprende anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica varios métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de  
60 aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable por las  
65 secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son

anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

**[0153]** La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado “mejor-ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como armazón (“framework”) humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza un armazón particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

**[0154]** Es también deseable en general que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras de conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor y secuencias importadas, de manera que se consigue la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

#### 4. Anticuerpos humanos

**[0155]** Los anticuerpos humanos anti-TAT226 de la presente invención se pueden construir mediante la combinación de la secuencia o secuencias del dominio variable del clon de Fv seleccionadas de las bibliotecas de expresión en fagos derivadas de humanos con una secuencia o secuencias de dominio constante humano tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos anti-TAT226 de la presente invención se pueden fabricar mediante el método del hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

**[0156]** Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión ( $J_H$ ) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

**[0157]** También se puede utilizar el barajado (“shuffling”) génico para derivar anticuerpos humanos a partir de no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo humano tiene las mismas afinidades y especificidades con el anticuerpo no humano de partida. Según este método, que también se denomina “impresión de epítopos”, la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de expresión en fagos tal como se describe aquí se sustituye por un repertorio de genes de dominios V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígenos da lugar al aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana, donde la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la correspondiente cadena no humana en el clon primario de expresión en fagos, es decir, el epítipo gobierna (imprime) la elección del compañero de la cadena humana. Cuando el proceso se repite para sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo (véase la PCT WO 93/06213 publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injertos de CDR, la técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

### 5. Anticuerpos biespecíficos

[0158] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por TAT226 y la otra por cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de TAT226. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TAT226. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAT226 y un brazo que se une al agente citotóxico, tales como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- $\alpha$ , alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

[0159] Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 publicada el 13 de mayo de 1993 y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655 (1991) se describen procesos similares.

[0160] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce, por ejemplo, con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (C<sub>H1</sub>) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera está presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo.

[0161] En una realización de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0162] Según otra estrategia, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase comprende por lo menos una parte del dominio CH<sub>3</sub> de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0163] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0164] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen

5 proteolíticamente para generar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditio, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos  $Fab'$  generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de  $Fab'$ -TNB se reconvierte a continuación en  $Fab'$ -tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de  $Fab'$ -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

10 [0165] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos  $Fab'$ -SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico  $F(ab')_2$  completamente humanizada. Cada fragmento de  $Fab'$  se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor  $HER^2$  y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

20 [0166] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de  $Fab'$  de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

30 [0167] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

### 35 6. Anticuerpos multivalentes

40 [0168] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. En ciertas realizaciones, el anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho. En una de dichas realizaciones, el anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender  $VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc$ , donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender además por lo menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además, comprenden un dominio CL.

### 60 7. Anticuerpos de dominio único

[0169] En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por

ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6,248,516 BI). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste en todo o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

#### 8. Variantes de anticuerpos

**[0170]** En algunas realizaciones, se contempla la modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos aquí. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar mediante la introducción de cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución puede hacer llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto en el momento en que se produce la secuencia.

**[0171]** Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son posiciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por rastreo de alanina", tal como se describe por Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas posiciones de aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación mediante la introducción de variantes adicionales u otras en los sitios de sustitución. De este modo, mientras que el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la acción de una mutación en un sitio determinado, se realiza la mutagénesis de rastreo de alanina o aleatorio en el codón o región diana y se criban las inmunoglobulinas expresadas por la actividad deseada.

**[0172]** Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales que varían de longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencias de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N terminal. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N o C terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en el suero.

**[0173]** En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención se altera para incrementar o disminuir el grado en el que se glicosila el anticuerpo. La glicosilación de polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión de un grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

**[0174]** La adición o deleción de sitios de glicosilación en el anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que se crea o elimina una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración se puede realizar mediante la adición, deleción o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

**[0175]** Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato maduro que carecen de mucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpos se referencian en WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y la patente de Estados Unidos No. 6,602,684, Umana et al. Los anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describen en WO 1997/30087, Patel et al. Véase, también WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) en referencia a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos. Véase también US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre las moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

**[0176]** En ciertas realizaciones, una variante de glicosilación comprende una región de Fc, donde una estructura de carbohidrato unida a la región de Fc carece de mucosa. Dichas variantes han mejorado la función de ADCC. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región de Fc (numeración de residuos según UE). Ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o

·deficientes en mucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen células CHO LeC13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de Estados Unidos No 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el ejemplo 11), y líneas celulares *knockout*, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO *knockout* (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

[0177] Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en la FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “sustituciones preferidas”. Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados “ejemplos de sustituciones”, en la Tabla 1 o tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y cribar los productos.

Tabla 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (U)	glu; asn	glu
Cys(C)	ser; ala	ser
Gln(Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	asp; gln	asp
Gly(G)	Ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	Trp; leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro(P)	Ala	ala
Ser(S)	Thr	thr
Thr(T)	Val; ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0178] Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar según las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H).

[0179] Alternativamente, los residuos naturales se pueden dividir en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr; Asn, Gln;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro;
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0180] Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por

otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservativos).

5 [0181] Un tipo de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración para afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan 10 varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se expresan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones a por lo menos parte de una proteína de recubrimiento de fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetada en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo (por ejemplo, rastreo de alanina) para 15 identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas conocidas en el sector, incluyendo las elaboradas aquí. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado utilizando técnicas 20 conocidas en el sector, incluyendo las descritas aquí, y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para un desarrollo posterior.

25 [0182] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

30 [0183] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

35 [0184] Según esta descripción y los conocimientos de la técnica, se contempla que, en algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo salvaje, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos, sin embargo, mantendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo salvaje. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar ciertas alteraciones en la región Fc que daría lugar a 40 una unión C<sub>1</sub>q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, tal como se describe en WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); Patente de Estados Unidos No. 5,648,260; Patente de Estados Unidos No. 5,624,821; y WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc. WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con una unión mejorada o disminuida a FcR. El contenido de estas publicaciones de patentes se 45 incorpora específicamente en la presente por referencia. Véase, también, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región de Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región de Fc a FcRn. Las 50 variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región de Fc alteradas y la capacidad de unión a C<sub>1</sub>q incrementada o disminuida se describen en la patente de Estados Unidos No. 6,194,551B1, WO99/51642. Los contenidos de estas publicaciones de patentes se incorporan específicamente en la presente por referencia. Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

55 [0185] En un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfase de los polipéptidos Fc que comprende la región Fc, donde las modificaciones facilitan y/o inducen a la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, donde la protuberancia es posicionable en la cavidad para inducir la 60 formación de complejos entre el primer y segundo polipéptido Fc. Los métodos de generación de anticuerpos con estas modificaciones son conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,731,168.

#### 9. Derivados de anticuerpos

65 [0186] Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente para contener grupos no proteínicos que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Preferiblemente, los grupos adecuados para la

derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Entre los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua se incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), polivinil alcohol, y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede presentar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se pueden determinar en base a las consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se utilizará en terapia bajo condiciones definidas, etc.

[0187] En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un grupo no proteínico que se pueden calentar selectivamente mediante la exposición a radiación. En una realización, el grupo no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que dañan las células normales, pero que calientan el grupo no proteínico hasta una temperatura en que se eliminan las células proximales al anticuerpo-grupo no proteínico.

B. Algunos métodos de fabricación de anticuerpos

#### 1. Algunos métodos de base de hibridoma

[0188] Los anticuerpos monoclonales anti-TAT226 de la presente invención se pueden fabricar utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o se pueden fabricar utilizando métodos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos No. 4,816,567).

[0189] En el método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los anticuerpos para TAT226 se desarrollan en general en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de TAT226 y un adyuvante. El TAT226 se puede preparar utilizando métodos conocidos en la técnica, algunas de las cuales se describen en detalle en la presente invención. Por ejemplo, TAT226 se puede producir recombinantemente. En una realización, los animales se inmunizan con un derivado de TAT226 que contiene una parte extracelular de TAT226 fusionado a la parte Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, los animales se inmunizan con una proteína de fusión TAT226-IgG1. En una realización, los animales se inmunizan con derivados inmunogénicos de TAT226 en una solución con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), y la solución se inyecta intradérmicamente en múltiples sitios. Dos semanas más tarde se reforzaron los animales. De siete a catorce días más tarde sangran los animales, y se analiza el suero por el título de anti-TAT226. Los animales se refuerzan hasta un nivel estable de título.

[0190] Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. A continuación, se fusionan los linfocitos con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág.59-103 (Academic Press, 1986)).

[0191] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

[0192] En ciertas realizaciones, las células de mieloma son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como un medio HAT. Entre las líneas de células de mieloma de ejemplo se incluyen, pero sin limitación, las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0193] Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a TAT226. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales

producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0194] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación convencionales de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad, etc.

## 2. Algunos métodos de cribado de bibliotecas

[0195] Los anticuerpos anti-TAT226 de la presente invención se pueden fabricar utilizando bibliotecas combinatorias para cribar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica varios métodos para generar bibliotecas de expresión en fagos y cribar dichas bibliotecas por anticuerpos que poseen las características de unión deseada. Dichos métodos se describen en general en Hoogenboom et al. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas realizaciones, en Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

[0196] En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante el cribado de bibliotecas de fagos que contienen el fago que expresa varios fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de recubrimiento del fago. Dichas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, de este modo, se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones que se unen se eluyen a continuación del antígeno y se pueden enriquecer posteriormente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-TAT226 de la presente invención se pueden obtener mediante el diseño de un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-TAT226 de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

[0197] En ciertas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo está formado de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de la cadena ligera (VL) y otra de la pesada (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden expresarse funcionalmente en los fagos, por ejemplo, como fragmentos de una sola cadena Fv (scFv), en los que VH y VL están unidas covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado con un dominio constante e interacciona de forma no covalente, tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Tal como se utiliza aquí, los clones de fagos que codifican scfv y los clones de fagos que codifican Fab se refieren colectivamente como "clones de fagos de Fv" o "clones de Fv".

[0198] Los repertorios de genes de VH y VL pueden clonarse separadamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, y a continuación se puede realizar la búsqueda de clones de unión al antígeno tal como se describió por Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio sin tratar puede clonarse para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos en un intervalo amplio de antígenos no propios y también de propios sin ninguna inmunización tal como se describió por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin tratar también se pueden fabricar sintéticamente mediante la clonación de los segmentos del gen V no reordenados de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y realizar el reordenamiento *in vitro* tal como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992);

[0199] En ciertas realizaciones, el fago filamentoso se utiliza para expresar fragmentos de anticuerpos mediante fusión con la proteína de recubrimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden expresarse como fragmentos Fv de una sola cadena, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, tal como se describe por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); o como fragmentos Fab, en los que se fusiona una cadena a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana, donde el ensamblamiento de una estructura Fab-proteína de recubrimiento se expresa en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de recubrimiento de tipo

salvaje, por ejemplo, tal como se describe en Hoogenboom et al., Nucl. Acids. Res., 19:4133-4137 (1991).

**[0200]** En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpo se obtiene de células inmunes recogidas de humanos o animales. Si se desea una biblioteca predispuesta a favor de clones anti-TAT226, el sujeto se inmuniza con TAT226 para generar una respuesta de anticuerpo, y se recuperan células de bazo y/o células B circulantes diferentes de linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos predispuesto a favor de clones anti-TAT226 mediante la generación de una respuesta de anticuerpo anti-TAT226 en ratones transgénicos que portan un grupo de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de manera que la inmunización con TAT226 produce células B que producen anticuerpos humanos contra TAT226. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

**[0201]** El enriquecimiento adicional para poblaciones de células reactivas anti-TAT226 se puede obtener utilizando un procedimiento de cribado adecuado para aislar células B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de TAT226, por ejemplo, mediante separación celular utilizando cromatografía de afinidad de TAT226 o adsorción de células a TAT226 marcada con fluorocromo seguido de la clasificación celular activada por flujo (FACS).

**[0202]** Alternativamente, la utilización de células del bazo y/o células B o de otros PBLs de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del repertorio de anticuerpos posibles y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos utilizando cualquier especie animal (humana o no humana) en que TAT226 no es antigénico. Para las bibliotecas que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se recogen las células madre del individuo para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunes de interés pueden obtenerse de diversas especies animales, como humano, ratón, rata, lagomorfos, luprinos, canino, felino, porcino, bovino, equino y especies aviares, etc.

**[0203]** El ácido nucleico que codifica segmentos de genes variables de anticuerpos (incluyendo segmentos VH y VL) se recupera de las células de interés y se amplifica. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reordenados, el ADN deseado puede obtenerse mediante aislamiento de ADN genómico o del mRNA de linfocitos seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se hibridan con los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reordenados, tal como se describe en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989), produciendo así repertorios de genes V diversos para la expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir del ADNc y de ADN genómico, con cebadores de sentido 3' de transcripción en el extremo 5' del exón codificante del dominio V maduro y cebadores de sentido 5' de transcripción basados en el segmento J, tal como se describe en Orlandi et al., *supra* y en Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del ADNc, los cebadores de sentido 3' de transcripción también pueden basarse en el exón líder tal como se describe en Jones et al., Biotechnol. 9:88-89 (1991), y los cebadores de sentido 5' de transcripción en la región constante tal como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores tal como se describe en Orlandi et al., *supra*, o Sastry et al., *supra*. En ciertas realizaciones, se maximiza la diversidad de bibliotecas mediante la utilización de cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V con el fin de amplificar todos los reordenamientos de VH y VL disponibles en la muestra de ácido nucleico de células inmunes, por ejemplo, tal como se describe en el procedimiento de Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), o como se describe en el procedimiento de Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducirse dianas de restricción raras dentro de los cebadores de PCR como una etiqueta en un extremo, tal como se describe en Orlandi et al., *supra*, o mediante amplificación por PCR posterior con un cebador etiquetado tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

**[0204]** Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente pueden derivarse *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de segmentos de genes-VH humanos se han clonado y secuenciado (publicado por Tomlinson et al., J.Mol. Biol., 227:776-798 (1992)) y se han localizado (publicado en Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden utilizarse para generar repertorios de genes VH diversos con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencias y longitudes varias, tal como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Los repertorios de VH también pueden fabricarse con toda la diversidad de secuencia focalizada en un bucle de H3 largo de una longitud única, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). También se han clonado y secuenciado segmentos V<sub>K</sub> y V<sub>L</sub> humanos (publicado por Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para fabricar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un grupo de pliegues de VH y VL, y de longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADNs que codifican genes V, se pueden reordenar segmentos de genes V de la línea germinal *in vitro* de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

**[0205]** Los repertorios de fragmentos de anticuerpo pueden construirse combinando repertorios de genes VH y VL juntos de muy diversas maneras. Cada repertorio puede crearse en vectores distintos, y los vectores pueden

combinarse *in vitro*, por ejemplo, tal como se describe en Hogrefe et al., *Gene*, 128:119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al., *Nucl. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993). La estrategia de recombinación *in vivo* explota la naturaleza de dos cadenas de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación en *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin tratar se clonan separadamente, uno en un fagémido y el otro en un vector de fagos. Las dos bibliotecas se combinan entonces mediante infección fágica de las bacterias que contienen el fagémido, de modo que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca se limita únicamente por el número de células presentes (aproximadamente  $10^{12}$  clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo*, de modo que los genes de VH y VL se recombinan en un único replicón y se co-empaquetan en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas proporcionan un gran número de anticuerpos diversos de buena afinidad ( $Kd^{-1}$  de aproximadamente  $10^{-8}$  M).

[0206] Alternativamente, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos mediante PCR y luego clonarse, tal como se describe en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991). El ensamblaje por PCR puede también utilizarse para unir ADNs de VH y VL con el ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de una sola cadena (scFv). En otra técnica, "el ensamblamiento por PCR en la célula" se utiliza para combinar los genes de VH y VL en los linfocitos mediante PCR y luego clonar los genes unidos, tal como se describe en Embleton et al., *Nucl. Acids. Res.* 20:3831-3837 (1992).

[0207] Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratar (naturales o sintéticas) pueden tener una afinidad moderada ( $Kd^{-1}$  de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7 M^{-1}$ ), pero la maduración para afinidad puede también ser simulada *in vitro* mediante la construcción y reselección a partir de bibliotecas secundarias, tal como se describe en Winter et al., (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación puede introducirse aleatoriamente *in vitro* utilizando una polimerasa propensa a errores (publicada en Leung et al., *Technique*, 1:11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración para afinidad puede realizarse mutando aleatoriamente una o más CDRs, por ejemplo, utilizando la PCR con cebadores que contienen una secuencia aleatoria que comprende la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y el posterior cribado de clones de mayor afinidad. La WO 96/07754 (publicada el 14 de marzo de 1996) describe un procedimiento para inducir la mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otra estrategia efectiva es recombinar los dominios VH y VL seleccionados mediante expresión en fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidos de donantes no inmunizados y el cribado de una mayor afinidad en diversas rondas de rebarajado de cadenas, tal como se describe en Marks col., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades de aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos.

[0208] El cribado de las bibliotecas se puede realizar mediante varias técnicas conocidas en el sector. Por ejemplo, TAT226 puede utilizarse para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresarse en células huésped fijadas a placas de adsorción o utilizarse en la clasificación celular, o conjugarse a biotina para la captura con partículas recubiertas con estreptavidina, o utilizarse en cualquier otro método para cribar bibliotecas de expresión en fagos.

[0209] Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con TAT226 inmovilizado bajo condiciones adecuadas para unirse a por lo menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares se selecciona para mimetizar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y a continuación se eluyen por ácido, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo tal como se describe en Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición con antígeno de TAT226, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígenos de Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden desarrollar en cultivos bacterianos y someterse a rondas posteriores de selección.

[0210] La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si los múltiples fragmentos de anticuerpos en un único fago pueden estar captados simultáneamente por el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débil) se pueden mantener mediante la utilización de lavados cortos, expresión en fagos multivalentes y densidad de recubrimiento elevada del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la unión de nuevo del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con una cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede inducir mediante la utilización de lavados largos y la expresión en fagos monovalentes tal como se describe en Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en WO 92/09690, y una densidad de recubrimiento baja de antígeno tal como se describe en Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

[0211] Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para TAT226. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por

ejemplo, realizada en algunas técnicas de maduración para afinidad) produzca muchos mutantes, la mayoría se unen al antígeno y unos pocos con mayor afinidad. Con la limitación de TAT226, se podría descartar fagos raros de afinidad elevada. Para mantener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos se pueden incubar con un exceso de TAT226 biotinilado, pero con el TAT226 biotinilado a una concentración de molaridad inferior a la constante de afinidad molar de la diana para TAT226. Los fagos de unión de afinidad elevada se pueden capturar a continuación mediante partículas paramagnéticas recubiertas por estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad más elevada de como mínimo dos veces a partir de una gran exceso de fagos con una afinidad inferior. Las condiciones utilizadas en fagos de lavado unidos a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar en base a la cinética de disociación.

[0212] Los clones anti-TAT226 se pueden seleccionar en base a la actividad. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos anti-TAT226 que se unen a células vivas que expresan TAT226 de forma natural. En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-TAT226 que bloquean la unión entre un ligando de TAT226 y TAT226, pero no bloquean la unión entre un ligando de TAT226 y una segunda proteína. Los clones de Fc correspondientes a dichos anticuerpos anti-TAT226 se pueden seleccionar mediante (1) el aislamiento de clones anti-TAT226 de una biblioteca de fagos tal como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente la amplificación de la población aislada de clones de fagos mediante el crecimiento de la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) la selección de TAT226 y una segunda proteína contra la que se desea una actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorción de los clones de fagos anti-TAT226 a TAT226 inmovilizado; (4) utilización de un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconoce los determinantes de unión a TAT226 que se solapan o son compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) elución de los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseados se pueden enriquecer adicionalmente mediante la repetición una o más veces de los procedimientos de selección descritos aquí.

[0213] El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones de Fv que se expresan en fago de la invención se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones que codifican las cadenas ligera y pesada de interés de hibridoma o plantilla de ADN de fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, y luego transfectarse en células huésped como por ejemplo *E. coli*, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN codificante del anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opin. Immunol., 5:256-262 (1993) y Plückthum, Immunol Revs. 130:151-188 (1992).

[0214] El ADN que codifica los clones de Fv de la presente invención se pueden combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constante de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, se pueden obtener secuencias de ADN apropiadas de Kabat et al., supra) para formar clones que codifican cadenas pesada y/o ligera de longitud completa o parcial. Se entenderá que para este objetivo se pueden utilizar las regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como humano) y a continuación y que a continuación se fusiona a ADN de región constante de otra especie animal para formar una secuencia o secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera "híbridas" de longitud completa se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" tal como se utiliza aquí. En ciertas realizaciones, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona a ADN de región constante humano para formar la secuencia o secuencias codificantes para las cadenas pesada y/o ligera humana de longitud completa o parcial.

[0215] El ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT226 derivado de un hibridoma de la presente invención también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o clon de Fv se pueden modificar adicionalmente mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no era inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tengan la especificidad de unión del clon de Fv o anticuerpos derivados del clon de hibridoma de la presente invención.

### 3. Vectores, células huésped y métodos recombinantes

[0216] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la presente invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican

las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula huésped a utilizar. En general, las células huésped preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente mamíferos). Se entenderá que se pueden utilizar regiones constantes de cualquier isotipo para este objetivo, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie humana o animal.

a) Generación de anticuerpos utilizando células huésped procariotas:

(1) *Construcción de vectores*

**[0217]** Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo de la presente invención se pueden obtener utilizando técnicas de recombinación estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas PCR. Una vez obtenidos, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Existen muchos vectores disponibles y conocidos en la técnica que se pueden utilizar para el objetivo de la presente invención. La selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y de la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogo, o ambos) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

**[0218]** En general, los vectores de plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en relación con estos huéspedes. El vector transporta normalmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporciona medios para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, o u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o ser modificados para contener, promotores que se pueden utilizar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter et al., Patente de estados Unidos No. 5,648,237.

**[0219]** Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo huésped se pueden utilizar como vectores transformantes en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago como  $\lambda$ GEM.TM.-11 en la fabricación de un vector recombinante que se puede utilizar para transformar células huéspedes susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

**[0220]** El vector de expresión de la presente invención puede comprender dos o más parejas promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' con respecto al cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas se clasifican normalmente en dos clases, inducible y constitutivo. El promotor inducible es un promotor que inicia mayores niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a los cambios en la condición del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

**[0221]** Se conoce una gran cantidad de promotores reconocidos por una serie de células huésped potenciales. El promotor seleccionado se puede unir operativamente a ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada mediante la extracción del promotor del ADN de origen a través de la digestión con enzima de restricción y la inserción de la secuencia del promotor aislada en el vector de la presente invención. Se pueden utilizar tanto la secuencia del promotor nativo como de promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general una mayor transcripción y rendimientos más elevados del gen diana expresado en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo.

**[0222]** Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, sistemas de promotores de la  $\beta$ -galactamasa y lactosa, un sistema de promotores de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor tac o el promotor trc. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en las bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Se ha publicado sus secuencias de nucleótidos, permitiendo así a un técnico unirlos a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

**[0223]** En un aspecto de la presente invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de la secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de la

membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el objetivo de la presente invención debería ser aquella que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariontas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II (STII) estable al calor, LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la presente invención, las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de la misma.

[0224] En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la presente invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula huésped, y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción en cada cistron. En este aspecto, se expresan las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas *trx-B* de *E. coli*) proporcionan condiciones del citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo así el pliegue y ensamblaje correctos de subunidades de proteínas expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

[0225] Los anticuerpos de la invención también se pueden producir utilizando un sistema de expresión en el que la proporción cuantitativa de los componentes del polipéptido expresado se puede modular con el fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y correctamente ensamblados de la invención. Dicha modulación se lleva a cabo como mínimo en parte mediante la modulación simultánea de fuerzas traduccionales para los componentes del polipéptido.

[0226] Una técnica para modular la fuerza traduccional se describe en Simmons et al., Patente de Estados Unidos. No. 5,840,523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) en un cistron. Para una TIR determinada, se puede crear una serie de variantes de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos con un intervalo de fuerzas traduccionales, proporcionando así un medio conveniente por el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan lugar a cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En ciertas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de las secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" en el inicio de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede conseguir mediante el cambio de la tercera posición de nucleótidos de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la fabricación del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

[0227] En una realización, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas TIR para cada cistron en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo varias combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR se pueden determinar mediante la cuantificación del nivel de expresión de un gen informador tal como se describe en detalle en Simmons et al. Patente de Estados Unidos No. 5, 840,523. En base a la comparación de la fuerza traduccional, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vectores de expresión de la presente invención.

[0228] Entre las células huésped procariontas adecuadas para expresar anticuerpos de la presente invención se incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. En una realización, se utilizan células Gram-negativas. En una realización, se utilizan células *E. coli* como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27,325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110  $\Delta fhua$  ( $\Delta tonA$ ) *ptR3 lac lq lacI8  $\Delta ompT$  ( $\Delta nmpc$ -*fepE*) *degP41 kanR* (Patente de Estados Unidos No. 5,639,635). También están disponibles otras cepas y derivados de la misma, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*<sub>h</sub> 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, como huésped se pueden utilizar de forma adecuada las especies *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* cuando se utilizan plásmidos conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para suministrar el replicón. Habitualmente la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de manera deseable inhibidores de proteasas adicionales en el cultivo celular.*

*(2) Producción de anticuerpos*

5 [0229] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medio nutriente convencional según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

10 [0230] La transformación significa introducir ADN en el huésped procariota, de manera que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro de calcio se utiliza en general para células bacterianas que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. Otro método para la transformación utiliza polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utilizada es la electroporación.

15 [0231] Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos de la presente invención se desarrollan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Entre los ejemplos de medios adecuados se incluyen caldo de luria (LB) más suplementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen de resistencia a ampicilina.

20

[0232] También se pueden incluir en las concentraciones apropiadas cualquier suplemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico introducidos solos o como una mezcla con otro suplemento medio, tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneitol y ditioneitol.

25

[0233] Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. En ciertas realizaciones, para el crecimiento de *E. coli*, las temperatura de crecimiento varían de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, o aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. En ciertas realizaciones, para *E. coli*, el pH es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,0.

30

[0234] Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la presente invención, se induce la expresión de proteínas bajo condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la presente invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. En ciertas realizaciones, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se puede utilizar un conjunto de otros inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica.

35

40

[0235] En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma y se recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas implica habitualmente la ruptura del microorganismo, generalmente mediante medios, tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, se pueden eliminar la debris celular o las células completas mediante centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad de resina. Alternativamente, las proteínas se pueden transportar en el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células se pueden extraer del cultivo y el sobrenadante de cultivo se filtra y concentra para una purificación posterior de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar posteriormente e identificarse utilizando métodos conocidos habitualmente, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

45

50

[0236] En un aspecto de la presente invención, la producción de anticuerpos se realiza en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Existen varios procedimientos de fermentación a gran escala de alimentación por lotes para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, y en ciertas realizaciones, aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a escala pequeña se refiere en general a la fermentación en un fermentador que no tiene más de 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

55

60

[0237] En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia habitualmente después de que las células hayan crecido bajo condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, DO550 de aproximadamente 180-220, en cuya fase las células se encuentran en una fase estacionaria inicial. Se pueden utilizar un conjunto de inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica y se ha

65

descrito anteriormente. Las células se pueden desarrollar durante periodos de tiempo más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se pueden utilizar una inducción de tiempo más larga o más corta.

5 [0238] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la presente invención, se pueden modificar varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje correcto y el pliegue de los polipéptidos anticuerpo secretados, se pueden utilizar vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para co-transformar las células huésped procariotas. Se ha demostrado que  
10 las proteínas chaperonas facilitan el correcto pliegue y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen et al. (1999) J Bio Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,083,715; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,027,888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

15 [0239] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), se pueden utilizar ciertas cepas huésped deficientes en enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped se pueden modificar para realizar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de E. coli deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), supra; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,264,365; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,508,192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

20 [0240] En una realización, las cepas de E. coli deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se utilizan como células huésped en el sistema de expresión de la presente invención.

### (3) Purificación de anticuerpos

30 [0241] En una realización, la proteína anticuerpo producida se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que sin sustancialmente homogéneas para ensayos y usos posteriores. Se pueden utilizar métodos de purificación de proteínas estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, "chromatofocusing", SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

40 [0242] En un aspecto, se utiliza la proteína A inmovilizada en una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos anticuerpos de la presente invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una gran afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida a la que se inmoviliza la proteína A puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

45 [0243] Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular tal como se ha descrito anteriormente, se puede aplicar a la fase sólida inmovilizada con proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. A continuación, la fase sólida se lavaría para eliminar contaminantes no unidos específicamente a la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

### b) Generación de anticuerpos utilizando células huésped eucariotas:

50 [0244] Entre los componentes del vector se incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

#### (1) Componente secuencia señal

60 [0245] Un vector para usar en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada puede ser la que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamíferos, se disponen las secuencias señal de mamíferos, así como las secuencias líderes secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex. El ADN para dicha región de precursor está ligada en el marco de lectura a ADN que codifica el anticuerpo.

(2) Origen de replicación

5 [0246] Generalmente, no es necesario un componente origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano.

(3) Componente de gen de selección

10 [0247] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea pertinente, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo.

15 [0248] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman de forma satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y sobreviven de esta manera al régimen de selección. Algunos ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

20 [0249] Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

25 [0250] Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identificaron por primera vez mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En algunas realizaciones, una célula huésped apropiada cuando se utiliza la DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

30 [0251] Alternativamente, se pueden seleccionar células huésped (particularmente huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente de Estados Unidos No. 4.965.199.

(4) Componente promotor

40 [0252] Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Las secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Por ejemplo, prácticamente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. En ciertas realizaciones, cualquiera o todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

50 [0253] La transcripción a partir de vectores en células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviario, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus del Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

60 [0254] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamíferos que utiliza el virus de papiloma bovino como vector. En la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Véase también Reyes et al., *Nature*, 297: 598-601 (1982) que describen la expresión de ADNc de  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus de herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

65

(5) *Componente elemento potenciador*

[0255] La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv. *Nature* 297:17-18 (1982) que describen elementos de potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en la posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido anticuerpo, pero se localiza generalmente en un sitio 5' desde el promotor.

(6) *Componentes de terminación de la transcripción*

[0256] Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucariotas también contendrán habitualmente las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y alguna vez desde 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la misma.

(7) *Selección y transformación de células huésped*

[0257] Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células eucariotas superiores, descritas en la presente invención, incluyendo células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10; células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO. Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0258] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(8) *Cultivo de células huésped*

[0259] Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo de la presente invención se puede cultivar en una serie de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 ó 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195 o la Patente de Estados Unidos Re. 30.985, se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fósforo), soluciones tampón (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN<sup>TM</sup>), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales a nivel micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede también incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán obvias para un técnico habitual.

(9) *Purificación de anticuerpo*

[0260] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, o se secreta directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, la debris particulada,

ya sea células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran generalmente en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de filtración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

**[0261]** La composición de anticuerpos preparada a partir de células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo ésta última la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isótopo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas humanas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  (Lindmark *et al.*, *J. Immunol Meth* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isótopos de ratón y para  $\gamma 3$  humanas (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero se disponen de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permite mayores velocidades de flujo y tiempos de procesado más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH<sub>3</sub>, la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker Philipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-Sefarosa™, cromatografía en una resina de intercambio de anión o catión (tal como una columna de ácido poliaspártico), "chromatofocusing", SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

**[0262]** Tras cualquier etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a una purificación adicional, por ejemplo, una cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente a concentraciones de sales bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

**[0263]** En general, están bien establecidas en el sector diversas metodologías para la preparación de anticuerpos para utilizar en investigación, ensayos y uso clínico, concordante con las metodologías descritas anteriormente y/o tal como se estime apropiado por un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

### C. Inmunoconjugados

**[0264]** La presente invención también se refiere a inmunoconjugados (referido indistintamente como "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC"), que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-TAT226 de la invención conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

**[0265]** Los inmunoconjugados se pueden utilizar para la liberación local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos para eliminar o inhibir el crecimiento o proliferación de células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; Patente de Estados Unidos No 4,975,278). Los inmunoconjugados permiten la liberación dirigida de un grupo farmacológico a un tumor, y la acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistémica de estos fármacos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad en células normales, así como en las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pág. 475-506). Se ha descrito que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como toxina de difteria, toxinas de plantas, tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler *et al* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler *et al* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden realizar sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan a anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

**[0266]** ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopos <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y unidos por un enlazador-quelante de tiourea (Wiseman *et al* (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman *et al* (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN presenta actividad contra el

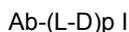
Linfoma no de Hodgkin (NHL) de células B, la administración da lugar a citopenias severas y prolongadas en la mayoría de pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), se aprobó en el 2000 un conjugado de anticuerpo-fármaco compuestos de anticuerpo CD33 hu unido a caliqueamicina para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patente de Estados Unidos No 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo C242 hu unido a través de un enlazador disulfuro SPP al grupo farmacológico de maitansinoide, DM1, está avanzando en las pruebas en la Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal para el antígeno de membrana específico antipróstata (PSMA) unido a un grupo farmacológico de maitansinoide, DM1, se encuentra en desarrollo para el potencial tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos a Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico a CD30 en tumores hematológicos) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y se encuentran bajo desarrollo terapéutico.

[0267] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-TAT226 y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en la presente memoria (por ejemplo, anteriormente). También se pueden utilizar y se describen aquí toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas.

[0268] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-TAT226 y una o más toxinas de molécula pequeña, incluyendo, pero sin limitación, fármacos de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoide, dolastatina, ausristatina, tricoteceno y CC1065 y los derivados de estos fármacos que tienen actividad de citotóxica. Ejemplos de dichos inmunoconjugados de describen en detalle a continuación.

#### 1. Inmunoconjugados de ejemplo

[0269] Un inmunoconjugado (o "conjugado anticuerpo-fármaco" ("ADC")) de la invención puede ser de fórmula I siguiente, en la que un anticuerpo anti-TAT226 está conjugado (es decir unido covalentemente) a uno o más grupos farmacológico (D) a través de un enlazador opcional (L).



Por consiguiente, el anticuerpo anti-TAT226 se puede conjugar al fármaco directamente o a través de un enlazador. En la fórmula I, p es el número promedio de grupos farmacológicos por anticuerpo, que pueden variar, por ejemplo, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 20 grupos farmacológicos por anticuerpo, y en ciertas realizaciones, desde 1 a aproximadamente 8 grupos farmacológicos por anticuerpo.

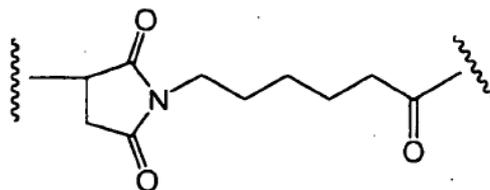
#### a) Enlazadores de ejemplo

[0270] Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores. Entre los ejemplos de componentes enlazadores se incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo (un "PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). En la técnica se conocen varios componentes enlazadores, algunos de los cuales se describen a continuación.

[0271] Un enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido (por ejemplo, hidrazona), un enlazador sensible a proteasa (por ejemplo, sensible a peptidasa), un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

[0272] En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una "unidad de extensión" que une un anticuerpo a otro componente enlazador o a un grupo farmacológico. Las unidades de extensión de ejemplo se muestran a continuación (donde la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo):

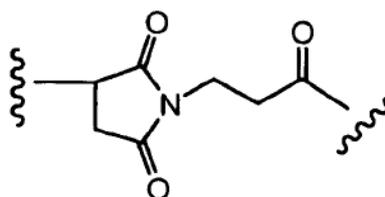
5



MC

10

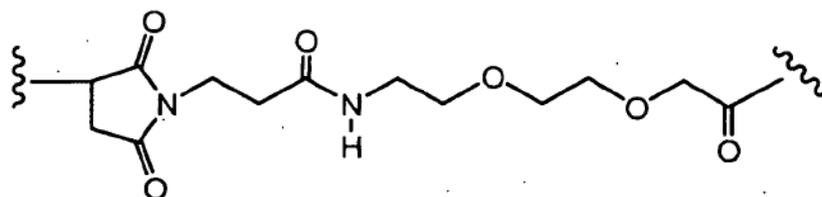
15



MP

20

25

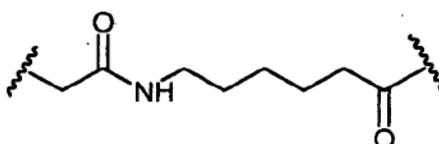


MPEG

30

35

40



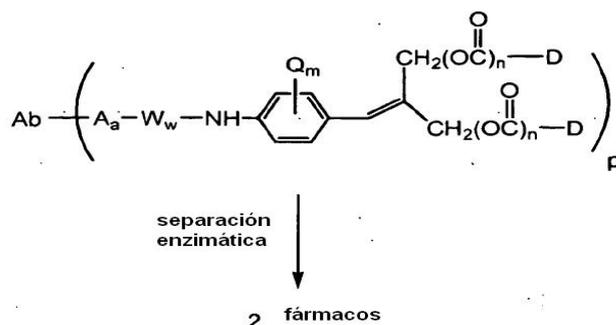
[0273] En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una unidad de aminoácidos. En una de dichas realizaciones, la unidad de aminoácidos permite la división del enlazador por una proteasa, facilitando de este modo la liberación del fármaco del inmunoconjugado tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosómicas. Véase, por ejemplo, Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784. Entre las unidades de aminoácidos de ejemplo se incluyen, pero sin limitación, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido y un pentapéptido. Entre los dipéptidos de ejemplo se incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); o N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Entre los tripéptidos de ejemplo se incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácidos puede comprender residuos de aminoácidos naturales, así como aminoácidos secundarios y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Las unidades de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la división enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D o una proteasa de plasmina.

[0274] En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una unidad "espaciadora" que une el anticuerpo a un grupo farmacológico, directamente o mediante una unidad de extensión y/o una unidad de aminoácidos. Una unidad espaciadora puede ser "autoinmolativa" o "no autoinmolativa". Una unidad espaciador "no autoinmolativa" es aquella en que parte o toda la unidad espaciadora permanece unida al grupo farmacológico tras la división enzimática (por ejemplo, proteolítica) del ADC. Entre los ejemplos de unidades no autoinmolativas se incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. También se contemplan otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptibles de división enzimática específica de secuencia. Por ejemplo, la división enzimática de un ADC que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina por una proteasa asociada a tumor daría lugar a la liberación de glicina-glicina-grupo farmacológico del resto del ADC. En una de dichas realizaciones, la glicina-glicina-grupo farmacológico se somete a continuación a una etapa de

hidrólisis separada en la célula tumoral, separando así la unidad espaciadora de glicina-glicina del grupo farmacológico.

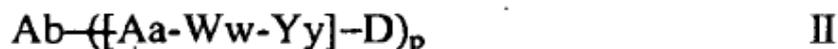
[0275] Una unidad espaciadora "autoinmolativa" permite la liberación del grupo farmacológico sin una etapa de hidrólisis separada. En ciertas realizaciones, una unidad espaciadora de un enlazador comprende una unidad de p-amino bencilo. En una de dichas realizaciones se une un p-aminobencil alcohol a una unidad de aminoácidos a través de un enlace amida, y se produce un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el alcohol bencilico y un agente citotóxico. Véase, por ejemplo, Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103. En una realización, la unidad espaciadora es p-aminobenciloxycarbonilo (PAB). En ciertas realizaciones, la parte de fenileno de una unidad de p-amino bencilo está sustituida con  $Q_m$ , donde Q es alquilo  $-C_1-C_8$ ,  $-O$ -(alquilo  $C_1-C_8$ ),  $-$ halógeno,  $-$ nitro o  $-$ ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4. Entre los ejemplos de unidades espaciadoras autoinmolativas se incluyen además, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares a p-aminobencil alcohol (véase, por ejemplo, US 2005/0256030 A1), tal como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales. Los espaciadores se puede utilizar para experimenta ciclaciones tras la hidrólisis del enlace amida, tal como amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223); sistemas anulares biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815); y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55; 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición  $\alpha$  de glicina (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmolativos útiles en ADC.

[0276] En una realización, una unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado tal como se describe a continuación, que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos.



en el que Q es alquilo  $-C_1-C_8$ ,  $-O$ -(alquilo  $C_1-C_8$ ),  $-$ halógeno,  $-$ nitro o  $-$ ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; n es 0 ó 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

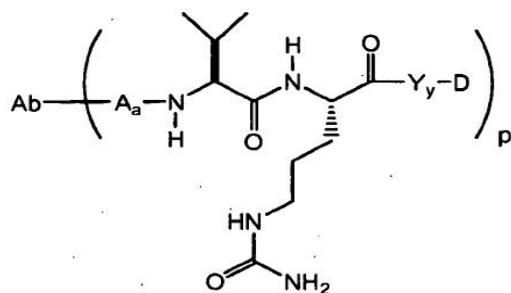
[0277] Un enlazador puede comprender uno o más de los componentes enlazadores anteriores. En ciertas realizaciones, un enlazador es tal como se muestra en paréntesis en el siguiente ADC de fórmula II



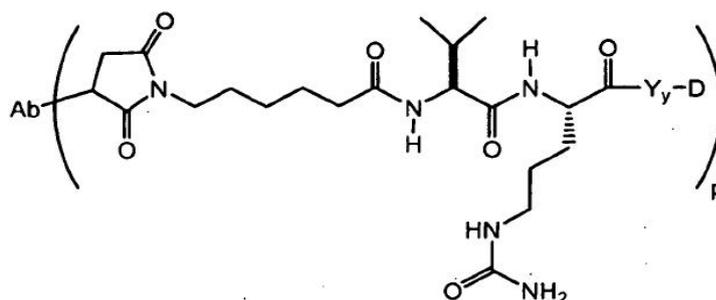
en el que A es una unidad de extensión, y a es un número entero de 0 a 1; W es una unidad de aminoácidos y w es un número entero de 0 a 12;

Y es una unidad espaciadora, e y es 0, 1 ó 2; y Ab, D, y p son tal como se han definido anteriormente para la Fórmula I. Realizaciones de ejemplo de dichos enlazadores se describen en US 2005-0238649 A1, que se incorpora en la presente invención por referencia.

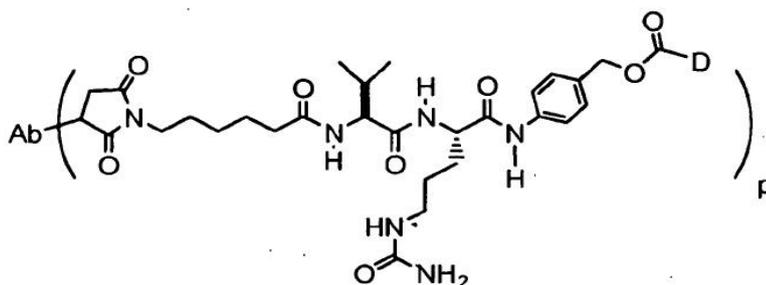
[0278] A continuación se muestran ejemplos de componentes enlazadores y combinaciones de los mismos en el contexto de ADC de fórmula II:



Val-Cit o VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

45 **[0279]** Los componentes enlazadores, incluyendo unidades de extensión, espaciadoras y de aminoácidos, se pueden sintetizar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en US 2005-0238649 A1.

b) Grupos farmacológicos de ejemplo

50 (1) *Maitansina y maitansinoides*

55 **[0280]** En algunas realizaciones, un inmunoc conjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a una o más moléculas maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto *Maytenus serrata* del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533.

60 **[0281]** Los grupos farmacológicos de maitansinoides son grupos farmacológicos atractivos en conjugados de anticuerpo-fármaco porque: (i) son relativamente accesibles para prepararse mediante fermentación o modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son susceptibles de derivación con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlaces no disulfuro a anticuerpos, (iii) son estables en plasma y (iv) son efectivos contra una variedad de líneas celulares de tumores.

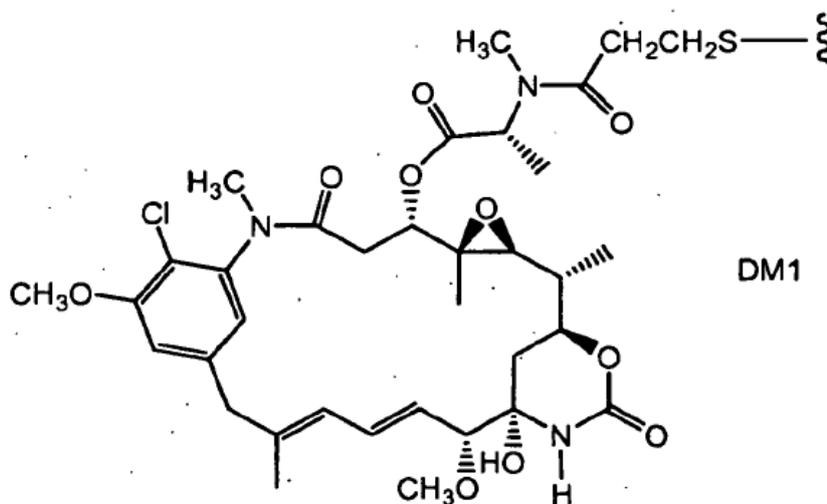
65

[0282] Los compuestos de maitansina adecuados para utilizar como grupos farmacológicos de maitansinoide son conocidos en la técnica y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos o producir utilizando técnicas de modificación genética (véase, Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973). También se pueden preparar sintéticamente maitansinol y análogos de maitansinol según métodos conocidos.

[0283] Ente los grupos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo se incluyen los que tienen un anillo aromático modificado, tales como C-19-decloro (Patente de Estados Unidos No. 4256746) (preparado mediante la reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-decloro (Patente de Estados Unidos Nos. 4361650 y 4307016) (preparado mediante la desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decloración utilizando LAH); y C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de Estados Unidos No. 4,294,757) (preparado mediante la acilación utilizando cloruros de acilo) y aquellos que presentan modificaciones en otras posiciones.

[0284] Ente los grupos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo también se incluyen los que presentan modificaciones tales como: C-9-SH (Patente de Estados Unidos No. 4424219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>); C-14-alcoximetil(desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR)(US 4331598); C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (Patente de Estados Unidos No. 4450254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (US 4364866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (Patente de Estados Unidos Nos. 4313946 y 4315929) (aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (Patentes de Estados Unidos Nos. 4362663 y 4322348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (US 4371533) (preparado mediante la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

[0285] Realizaciones de grupos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo incluyen DM1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:



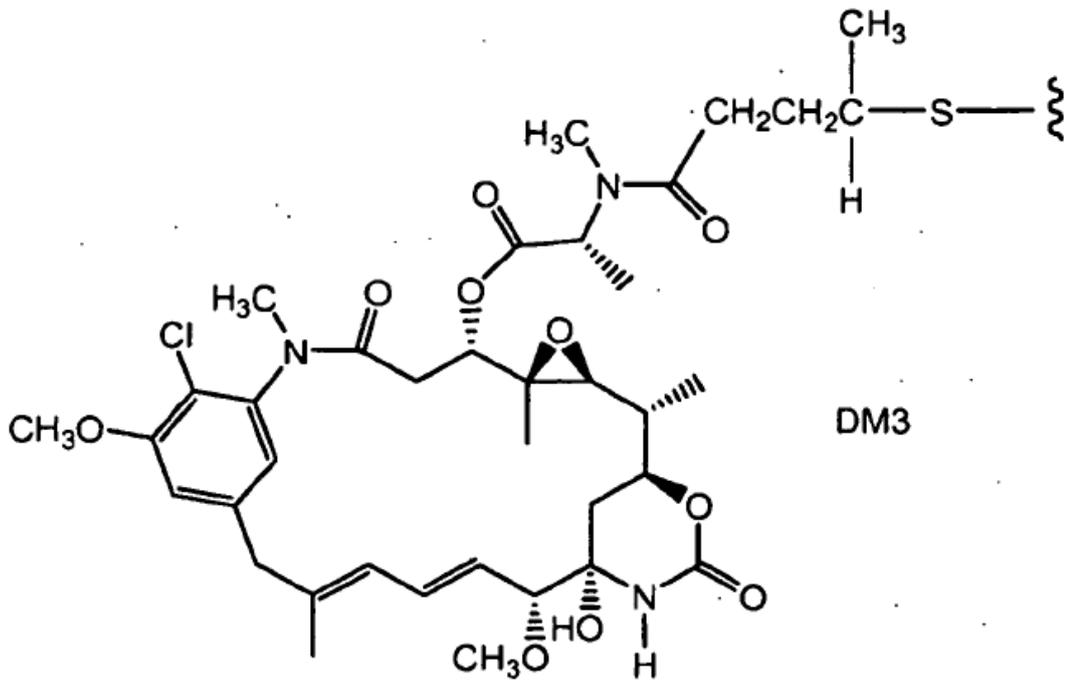
5

10

15

20

25



30

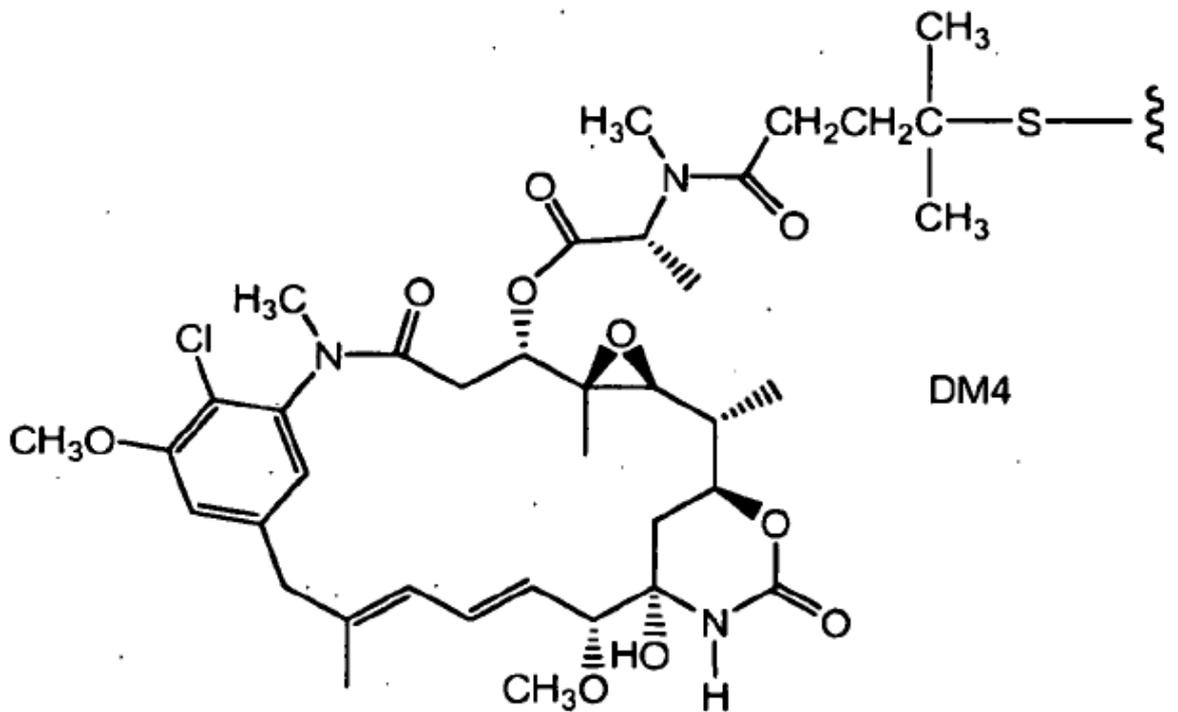
35

40

45

50

55

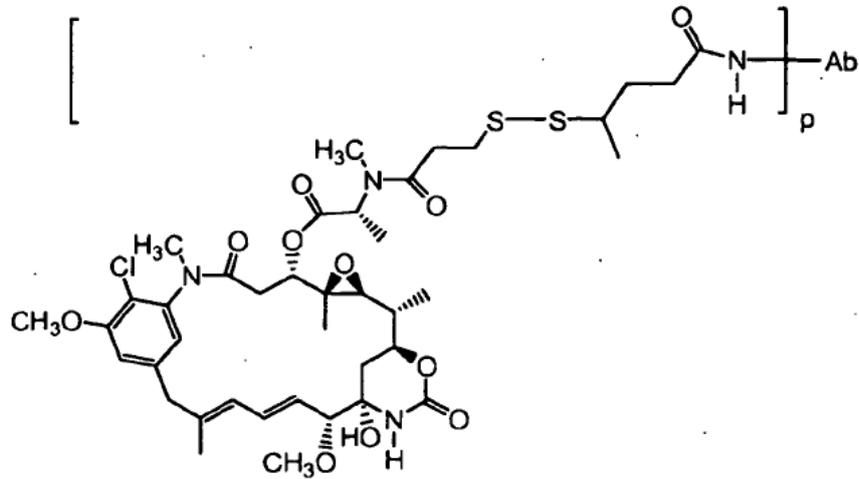


60

donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco al enlazador (L) de un conjugado anticuerpo-fármaco. Se ha descrito HERCEPTIN® (trastuzumab) unido por SMCC a DM1 (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A).

[0286] Otros conjugados anticuerpo-fármaco de maitansinoide de ejemplo tienen las siguientes estructuras y abreviaturas, (donde Ab es anticuerpo y p es de 1 a aproximadamente 8):

5



Ab-SPP-DM1

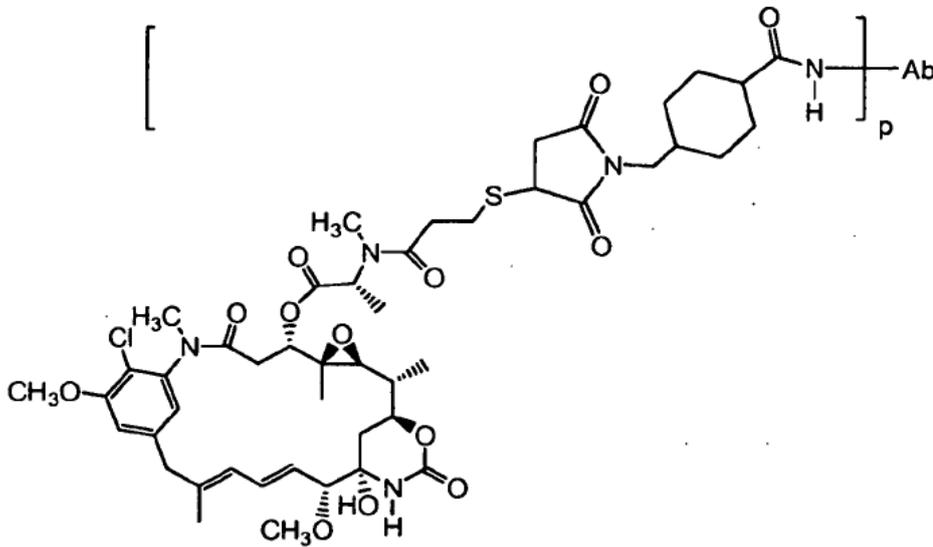
20

25

30

35

40



Ab-SMCC-DM1

45

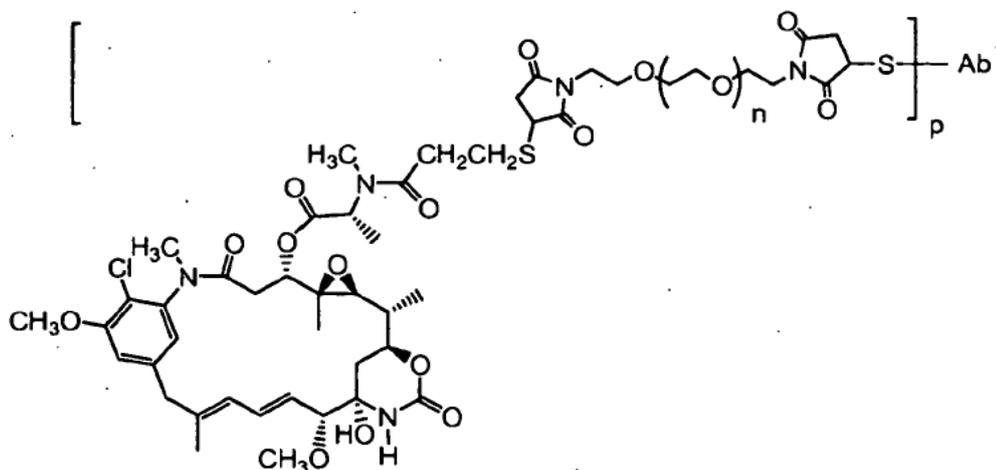
[0287] Conjugados anticuerpo-fármaco de ejemplo donde DM1 está unido a través de un enlazador BMPEO a un grupo tilo del anticuerpo tiene la estructura y abreviatura:

50

55

60

65



donde Ab es anticuerpo; n es 0, 1, ó 2; y p es 1, 2, 3, ó 4.

[0288] Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos de fabricación de los mismos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064, US 2005/0276812 A1 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente en la presente por referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C<sub>2</sub>42 dirigido contra el cáncer colorectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide a través de un enlace disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10<sup>5</sup> antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía incrementar mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

[0289] Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5,208,020 (la memoria de la cual se incorpora expresamente en la presente por referencia). Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado una eficacia en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

[0290] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) y US 2005/016993 A1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente en la presente por referencia. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprende el componente enlazador SMCC se pueden preparar tal como se ha descrito en US 2005/0276812 A1, "Antibody-drug conjugates and Methods." Los enlazadores comprenden grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente. Enlazadores adicionales se describen y ejemplifican en la presente invención.

[0291] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). En ciertas realizaciones, el agente de acoplamiento es N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), o N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0292] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

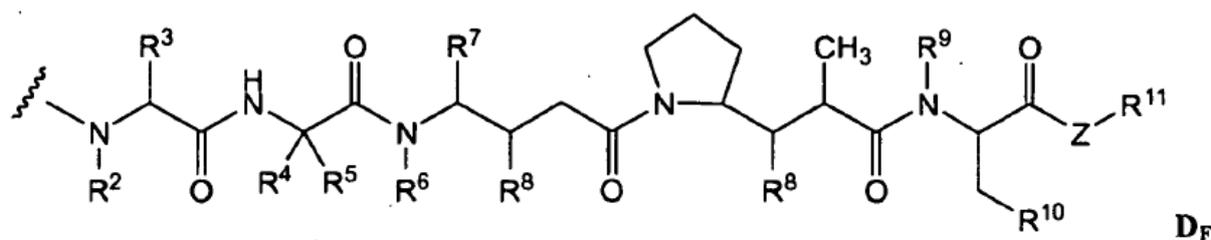
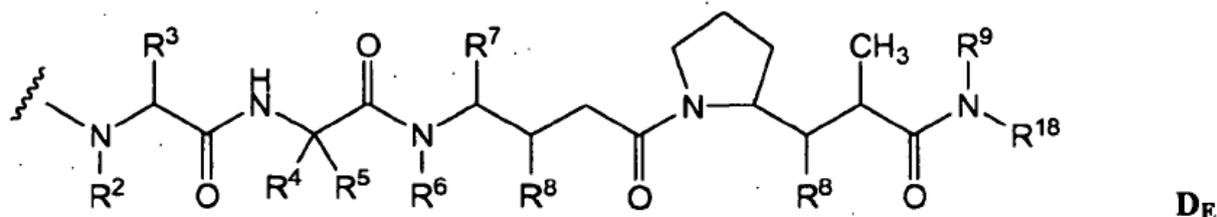
(2) Auristatinas y dolastatinas

[0293] En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a dolastatina o un análogo o derivado peptídico de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (Patente de Estados Unidos Nos. 5635483; 5780588). Se han observado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (Patente de Estados Unidos No.5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El grupo farmacológico de dolastatina o auristatina se

puede unir al anticuerpo a través del extremo N (amino) o C (carboxilo) del grupo farmacológico peptídico (WO 02/088172).

[0294] Las realizaciones de auristatina de ejemplo incluyen los grupos farmacológicos D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub> de monometilauristatina unidos por el N terminal, descritos en Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Resumen Número 623, presentado el 28 de marzo del 2004, la memoria de la cual se incorpora expresamente por referencia en su totalidad.

[0295] Un grupo farmacológico peptídico se puede seleccionar entre las fórmulas D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub> siguientes:



donde la línea ondulada de D<sub>E</sub> y D<sub>F</sub> indica el sitio de unión covalente a un anticuerpo o componente anticuerpo-enlazador, e independientemente en cada punto:

R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbocilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>4</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbocilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R<sup>6</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>7</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>9</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>10</sup> se selecciona entre arilo o heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>;

Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, donde R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>11</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;

m es un número entero que varía desde 1 a 1000;

R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>14</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

cada caso de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

cada caso de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;

R<sup>18</sup> se selecciona entre -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo, -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), y -C(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>);

y

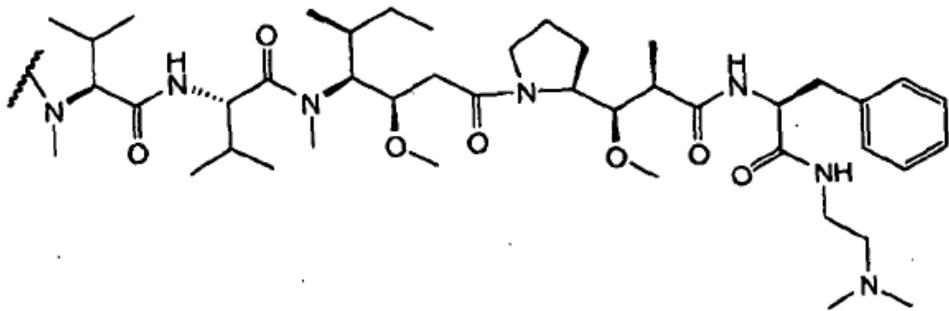
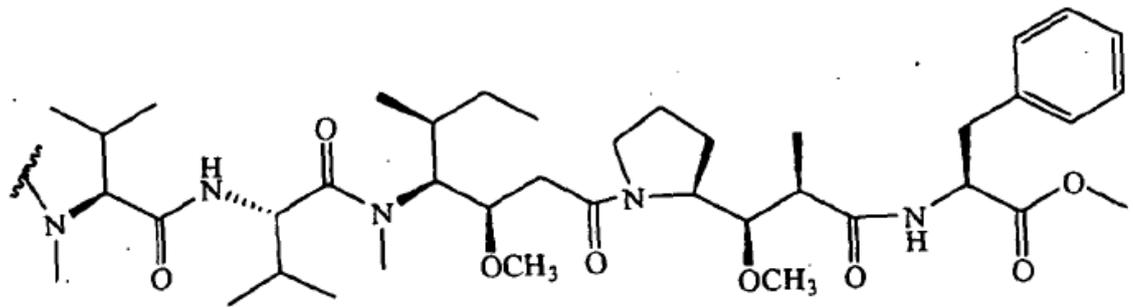
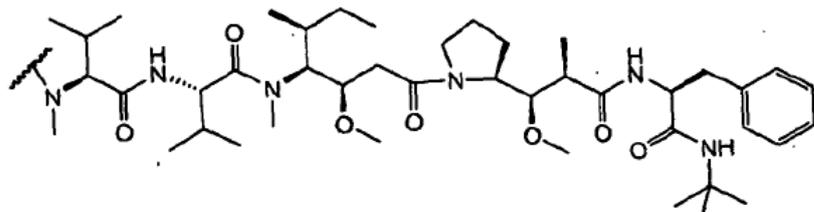
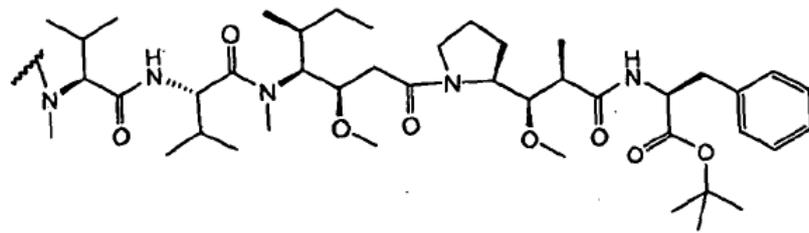
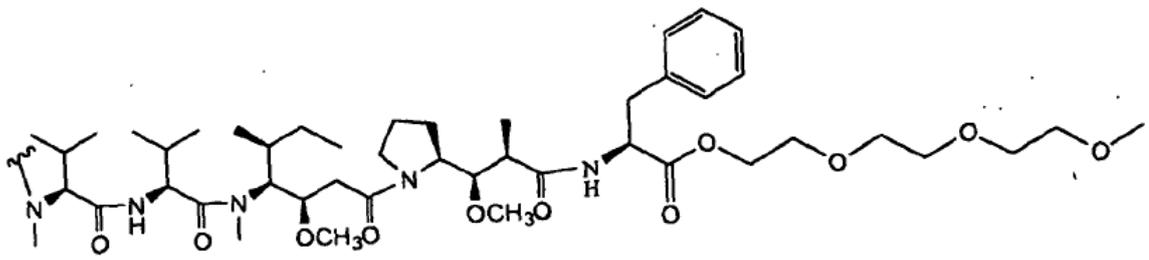
n es un número entero que varía de 0 a 6.

[0296] En una realización, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o sec-butilo y R<sup>5</sup> es -H o metilo. En una realización de ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es -H, y R<sup>7</sup> es sec-butilo.

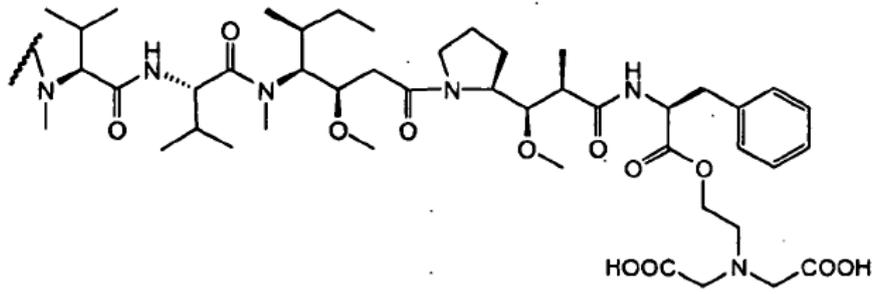
[0297] En otra realización, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, y R<sup>9</sup> es -H.



5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



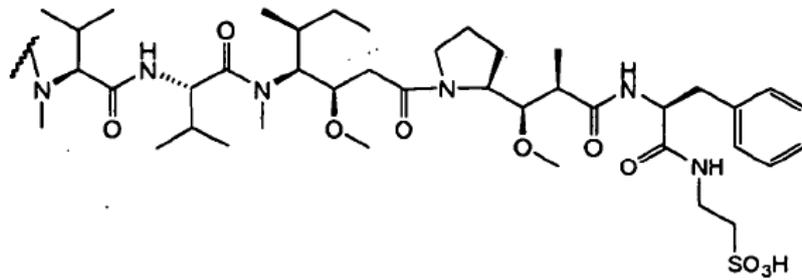
5



10

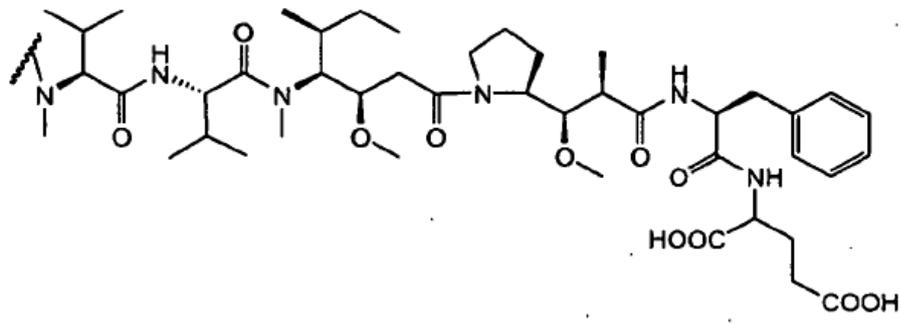
15

20



25

30

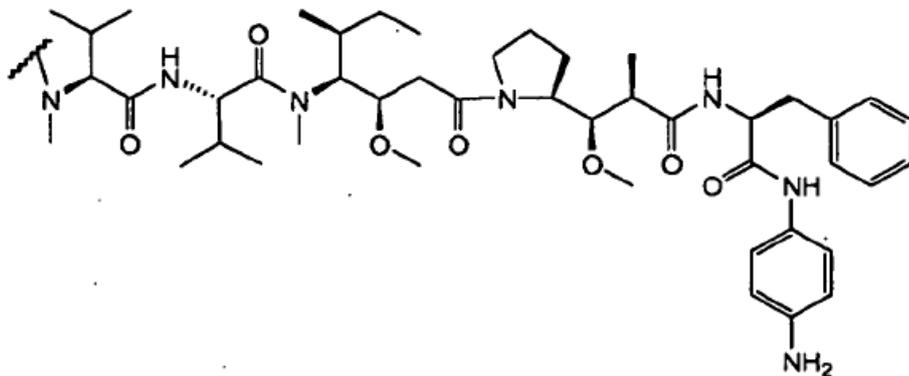


35

40

y

45



50

55

[0309] En un aspecto, los grupos hidrofílicos que incluyen, pero sin limitación, ésteres de trietilenglicol (TEG), tal como se muestra anteriormente, se pueden unir al grupo farmacológico en R<sup>11</sup>. Sin estar unido por ninguna teoría particular, los grupos hidrofílicos ayudan a la internalización y no aglomeración del grupo farmacológico.

[0310] Las realizaciones de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden una auristatina/dolastatina o derivados de las mismas se describen en US 2005-0238649 A1 y Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124, que se incorpora expresamente aquí por referencia. Las realizaciones de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden



(3) *Caliqueamicina*

[0314] En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-acetil- $\gamma_1^1$ , PSAG, y  $\theta_1^1$  (Hinman et al, CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

c) Otros agentes citotóxicos

[0315] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos de la presente invención incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

[0316] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, 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 de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

[0317] La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa)

[0318] En ciertas realizaciones, el inmunoconjugado puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el inmunoconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo  $tc^{99m}$  o  $I^{123}$ , o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0319] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el inmunoconjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como,  $tc^{99m}$  o  $I^{123}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$  e  $In^{111}$  se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El método de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

[0320] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo anti-TAT226 de la invención conjugado a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) en un fármaco activo, tal como un fármaco anticanceroso. Dichos inmunoconjugados son útiles en la terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT). Las enzimas que se pueden conjugar a un anticuerpo anti-TAT226 de la invención incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalinas, que son útiles para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasas, que son útiles para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, que es útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, que son útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que dividen los carbohidratos, tales como  $\beta$ -galactosidasa y neuraminidasa, que son útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres;  $\beta$ -lactamasa, que es útil para convertir fármacos derivatizados con  $\beta$ -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, que son útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Las enzimas se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-TAT226 de

la invención mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en el sector. Véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984).

d) Carga de fármaco

[0321] La carga de fármaco se representa por  $p$ , el número promedio de grupos farmacológicos por anticuerpo en una molécula de fórmula I. La carga de fármacos puede variar desde 1 a 20 grupos farmacológicos (D) por anticuerpo. Los ADC de Fórmula I incluyen grupos de anticuerpos conjugados con un grupo de grupos farmacológicos, de 1 a 20. El número promedio de grupos farmacológicos por anticuerpo en preparaciones de ADC de las reacciones de conjugación se pueden caracterizar mediante medios convencionales, tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de  $p$ . En algunos casos, también se puede conseguir la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneos donde  $p$  es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco mediante medios, tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

[0322] Para algunos conjugados anticuerpo-fármaco,  $p$  puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión en un tiol de cisteína, como en las realizaciones de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener sólo uno o varios grupos de tiol de cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos mediante los cuales se puede unir un enlazador. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco más elevada, por ejemplo  $p > 5$ , puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco para un ADC de la presente invención varía desde 1 hasta aproximadamente 8; desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6; o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5. De hecho, se ha observado que para ciertos ADC, la proporción óptima de grupos farmacológicos por anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5. Véase US 2005-0238649 A1.

[0323] En ciertas realizaciones, se conjugan menos del máximo teórico de grupos farmacológicos a un anticuerpo durante la reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el intermedio enlazador del fármaco o el reactivo enlazador, tal como se describe a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que se puedan unir a un grupo farmacológico; de hecho, la mayoría de residuos de tiol de cisteína en anticuerpos existen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se puede reducir con un agente reductor, tal como ditiotreitól (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), bajo condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos de tiol de cisteína reactivos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos, tales como lisina o cisteína.

[0324] La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de diferentes maneras, por ejemplo, mediante: (i) la imitación del exceso molar de intermedio enlazador a fármaco o reactivo enlazador en relación al anticuerpo, (ii) la limitación del tiempo de reacción o la temperatura de conjugación, y (iii) condiciones reductivas parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína.

[0325] Debe entenderse que cuando reacciona más de un grupo nucleofílico con un intermedio del enlazador a fármaco o reactivo enlazador seguido de un reactivo grupo farmacológico, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más grupos farmacológicos unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante un ensayo dual de anticuerpos ELISA, que es específico para anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas individuales de ADC se pueden identificar en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrofóbica (véase, por ejemplo, Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Resumen No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, Marzo 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Resumen No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, Marzo 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, Marzo 2004). En ciertas realizaciones, un ADC homogéneo con un único valor de carga se puede aislar de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

e) Algunos métodos de preparación de inmunoconjugados

[0326] Un ADC de fórmula I se puede preparar mediante varias rutas que utilizan reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) la reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ab-L a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo farmacológico D; y (2) la reacción de un grupo nucleofílico de un grupo farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Métodos de ejemplo para preparar un ADC de fórmula I a través de la última ruta se describen en US 2005-0238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente por referencia.

[0327] Entre los grupos nucleofílicos en los anticuerpos se incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amina de azúcares donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los fragmentos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos presentan enlaces disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden volver reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), de manera que el anticuerpo es totalmente o parcialmente reducido. Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales se pueden introducir en anticuerpos a través de la modificación de residuos de lisina, por ejemplo, mediante la reacción de residuos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando lugar a la conversión de una amina en tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en un anticuerpo mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, mediante la preparación de anticuerpos variantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

[0328] Los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención también se pueden producir mediante la reacción entre un grupo electrofílico en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleofílico en un reactivo enlazador o fármaco. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo enlazador se incluyen, pero sin limitación, hidrazina, oxima, amina, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una realización, se modifica un anticuerpo para introducir grupos electrofílicos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o fármaco. En otra realización, los azúcares de anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o grupos farmacológicos. Los grupos resultantes de iminas base de Schiff pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen los residuos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con metaperyodato sódico dando lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un nucleófilo de grupo farmacológico o enlazador.

[0329] Entre los grupos nucleofílicos en un grupo farmacológico se incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los fragmentos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida.

[0330] Los compuestos de la presente invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con los siguientes reactivos reticulantes: 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 está disponible comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véase las páginas 467-495, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

[0331] Los inmunconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico también se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metil dietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0332] Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican el anticuerpo y partes citotóxicas del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separados por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0333] En otra realización, un anticuerpo se puede conjugar a un “receptor” (tal como estreptavidina) para la utilización en el prereconocimiento de un tumor, en la que se administra el conjugado anticuerpo-receptor al paciente, seguido de la extracción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

#### D. Formulaciones farmacéuticas

[0334] En un aspecto, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden por lo menos un anticuerpo anti-TAT226 de la presente invención y/o por lo menos un inmunoconjugado del mismo. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-TAT226 y/o un inmunoconjugado del mismo, y 2) un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-TAT226 y/o un inmunoconjugado del mismo, y opcionalmente, 2) por lo menos un agente terapéutico adicional. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitación, los descritos en la Sección E.2.

[0335] Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo o inmunoconjugado que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras formulaciones en seco. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio); fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas a utilizar para la administración in vivo son en general estériles. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0336] Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0337] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico liberan las moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos o inmunoconjugados encapsulados permanecen en el organismo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, el uso de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones específicas de la matriz de polimérica.

## E. Métodos de utilización de anticuerpos anti-TAT226 e inmunoconjugados

## 1. Métodos de diagnóstico y métodos de detección

5 **[0338]** Los anticuerpos anti-TAT226 e inmunoconjugados de la presente invención son útiles para detectar la presencia de TAT226 en una muestra biológica. El término "detectar" tal como se utiliza aquí comprende una detección cuantitativa o cualitativa. Una muestra biológica puede comprender una célula o tejido, tales como los tejidos indicados en la figura 13. Dichos tejidos pueden incluir tejidos normales y/o cancerosos que expresan TAT226 a niveles superiores en relación a otros tejidos, por ejemplo, ovario, riñón, cerebro, endometrio, glándulas  
10 adrenales, huesos, pulmón, piel y tejido blando.

**[0339]** Entre los trastornos proliferativos celulares de ejemplo que se pueden diagnosticar utilizando un anticuerpo de la presente invención se incluyen patologías cancerosas, tales como tumores, por ejemplo, carcinomas (tumores epiteliales) y blastomas (tumores derivados de tejido embrionario), y, en ciertas realizaciones, cáncer de ovario, cáncer de útero (incluyendo cáncer de endometrio), y cáncer de riñón, incluyendo nefroblastomas (por ejemplo, tumor de Wilm). El cáncer de ovario, en particular, comprende un grupo heterogéneo de tumores malignos derivados de ovario. Aproximadamente el 90% de los tumores de ovario malignos son de origen epitelial; el resto son tumores de células germinales y estromales. Los tumores de ovario epiteliales se clasifican en los siguientes subtipos histológicos: adenocarcinomas serosos (que constituyen aproximadamente el 50% de los tumores de ovario epiteliales); adenocarcinomas de endometrio (~20%); adenocarcinomas mucinosos (~10%); adenocarcinomas de células claras (~5-10%); tumores de Brenner (células transicionales) (relativamente no común). El pronóstico del cáncer de ovario, que es el sexto cáncer más común en mujeres, es normalmente irregular, con unas tasas de supervivencia de cinco años que varían entre el 5 y el 30%. Para revisión del cáncer de ovario, véase, Fox et al. (2002) "Pathology of epithelial ovarian cancer," en Ovarian Cancer ch. 9 (Jacobs et al., eds., Oxford University Press, New York); Morin et al. (2001) "Ovarian Cancer," en Enciclopedia Reference of Cancer, pp.654-656 (Schwab, ed., Springer-Verlag, New York). La presente invención contempla métodos de diagnóstico o tratamiento de cualquiera de los subtipos de tumores de ovario epiteliales descritos anteriormente, y en particular el subtipo de adenocarcinoma seroso.  
15  
20  
25

30 **[0340]** En ciertas realizaciones, un método de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-TAT226 a TAT226 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membranas obtenida de una célula que expresa TAT226 en su superficie. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-TAT226 bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-TAT226 a TAT226, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-TAT226 y TAT226 en la superficie celular. Un ensayo de ejemplo para detectar la unión de un anticuerpo anti-TAT226 a TAT226 expresado en la superficie de una célula es un ensayo "FACS", tal como se describe en el Ejemplo D, siguiente.  
35

**[0341]** Se pueden utilizar otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-TAT226 a TAT226. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a antígeno que son conocidos en la técnica, tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IGC).  
40

45 **[0342]** En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-TAT226 están marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o grupos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, electrodenso, quimioluminiscente y radioactivos), así como grupos, tales como enzimas o ligando, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Entre los marcadores de ejemplo se incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, y <sup>131</sup>I, fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidada de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, en acoplamiento con una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de spin, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.  
50  
55

**[0343]** En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-TAT226 se inmovilizan en una matriz insoluble. La inmovilización implica la separación del anticuerpo anti-TAT226 de cualquier TAT226 que permanece libre en la solución. Esto se consigue normalmente mediante la insolubilización del anticuerpo anti-TAT226 antes del procedimiento de ensayo, como mediante la adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., U.S. 3,720,760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando glutaraldehído reticulante), o mediante la insolubilización del anticuerpo anti-TAT226 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-TAT226 y TAT226, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.  
60  
65

[0344] Cualquiera de las realizaciones de diagnóstico o detección anteriores se puede llevar a cabo utilizando un inmunocombinado de la invención en lugar o adicionalmente a un anticuerpo anti-TAT226.

## 2. Métodos terapéuticos

5 [0345] Un anticuerpo o inmunocombinado de la presente invención se pueden utilizar en, por ejemplo, métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*.

10 [0346] "Inhibir el crecimiento o proliferación celular" significa disminuir el crecimiento o proliferación de una célula en por lo menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ó 100%, e incluye la inducción de la muerte celular. En ciertas realizaciones, la célula es una célula tumoral. En ciertas realizaciones, la célula es una célula tumoral de ovario, una célula tumoral de útero, una célula tumoral de cerebro o una célula tumoral de riñón. En ciertas realizaciones, la célula es un xenoinjerto, por ejemplo, tal como se ejemplifica aquí.

15 [0347] Un anticuerpo o inmunocombinado de la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo celular. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo celular está asociado con un aumento de la expresión y/o actividad de TAT226. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo celular está asociado con un aumento de la expresión de TAT226 en la superficie de una célula. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo celular es un tumor o un cáncer. Ejemplos de trastornos proliferativos celulares a tratar por los anticuerpos o inmunocombinados de la presente invención incluyen, pero sin limitación, patologías cancerosas, tales como tumores, por ejemplo, carcinomas (tumores epiteliales) y blastomas (tumores derivados de tejido embrionario) y, en ciertas realizaciones, cáncer de ovario; cáncer uterino, incluyendo cáncer de endometrio; tumores de cerebro (por ejemplo, astrocitomas, que comprende 103 gliomas de fase avanzada, también denominados como glioblastoma multiforme); y cáncer de riñón, incluyendo nefroblastomas (por ejemplo, tumor de Wilms).

20 [0348] Se describen aquí métodos para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular que comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-TAT226 o un inmunocombinado del mismo. En ciertas realizaciones, un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-TAT226 y, opcionalmente, por lo menos un agente terapéutico adicional, tales como los proporcionados a continuación. En ciertas realizaciones, un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende 1) un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-TAT226 y un agente citotóxico; y opcionalmente, 2) por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como los descritos a continuación.

30 [0349] En un aspecto, por lo menos algunos de los anticuerpos o inmunocombinados de la presente invención se pueden unir a TAT226 de especies diferentes de un ser humano. Por consiguiente, los anticuerpos o inmunocombinados de la presente invención se pueden utilizar para unirse a TAT226, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene TAT226, en humanos, o en otros mamíferos que tienen un TAT226 con el que reacciona de forma cruzada un anticuerpo o inmunocombinado de la presente invención (por ejemplo, chimpancé, babuino, títí, monos cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, un anticuerpo anti-TAT226 o inmunocombinado se pueden utilizar para inhibir una actividad de TAT226 mediante el contacto del anticuerpo o inmunocombinado con TAT226, de manera que se inhibe la actividad de TAT226. En una realización, el TAT226 es TAT226 humano.

45 [0350] Un anticuerpo anti-TAT226 o inmunocombinado se pueden utilizar en un método para unirse a TAT226 en un individuo que padece un trastorno asociado con un aumento de la expresión y/o actividad de TAT226, comprendiendo el método administrar al individuo el anticuerpo o inmunocombinado, de manera que se une el TAT226 en el individuo. En una realización, el TAT226 es TAT226 humano, y el individuo es un individuo humano. Alternativamente, el individuo puede ser un mamífero que expresa TAT226 al que se une un anticuerpo anti-TAT226. Además el individuo puede ser un mamífero al que se ha introducido TAT226 (por ejemplo, mediante la administración de TAT226 o mediante la expresión de un transgén que codifica TAT226).

50 [0351] Un anticuerpo anti-TAT226 o inmunocombinado se pueden administrar a un humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo anti-TAT226 o inmunocombinado se pueden administrar a un mamífero no humano que expresa TAT226 con el que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a éste último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos o inmunocombinados de la presente invención (por ejemplo, análisis de dosis y evolución con el tiempo de la administración).

60 [0352] Los anticuerpos o inmunocombinados de la presente invención se pueden utilizar solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunocombinado de la presente invención se pueden administrar simultáneamente con por lo menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. En una de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes utilizados en el tratamiento del cáncer de ovario, tales como un compuesto de platino (por

ejemplo, cisplatino o carboplatino); un taxano (por ejemplo, paclitaxel o docetaxel); topotecano; una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina (ADRIAMYCIN®) o doxorubicina liposomal (DOXIL®)); gemcitabina; ciclofosfamida; vinorelbina (NAVELBINE®); hexametilmelamina; ifosfamida; y etopósido. En otra de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o combinación de agentes utilizados en el tratamiento de cáncer uterino o de endometrio, tales como cisplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel, metotrexato, fluorouracilo y medroxiprogesterona. En otra de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o combinación de agentes utilizados en el tratamiento de tumores de cerebro, tales como una nitrosourea (por ejemplo, carmustina o lomustina); un agente citotóxico (por ejemplo, irinotecano o temozolamida); un agente antiangiogénico (por ejemplo, talidomida, TNP-470, factor de plaquetas 4, interferón y endostatina); un agente diferenciante (por ejemplo, retinoides, fenilbutirato, fenilacetato, y anti-neoplastones); un agente antiinvasiones (por ejemplo, inhibidores de metaloproteinasas de matriz, tales como marimastato); un modulador de la transducción de señales (por ejemplo, tamoxifeno, briostatina, y O-6 benciguanina); un inhibidor de topoisomerasa (por ejemplo, irinotecano o topotecano); y un inhibidor del factor de crecimiento (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa). En otra de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o combinación de agentes utilizados en el tratamiento de cáncer de riñón (por ejemplo, tumor de Wilms), tales como vincristina, actinomicina D, adriamicina, doxorubicina, ciclofosfamida, ifosfamida, etopósido, y carboplatino. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención se puede combinar con un antiinflamatorio y/o antiséptico.

**[0353]** Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención puede tener lugar antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención también se pueden utilizar en combinación con terapia de radiación.

**[0354]** Un anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención (y cualquier agente terapéutico adicional o adyuvante) se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y si se desea un tratamiento local, administración intramuscular. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra de manera adecuada mediante infusión a pulsos, particularmente con dosis descendientes del anticuerpo o inmunoconjugado. La dosificación se puede realizar mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

**[0355]** Cuando la diana de unión se localiza en el cerebro, algunas realizaciones de la presente invención proporcionan el anticuerpo o inmunoconjugado para atravesar la barrera hemato-encefálica. Existen varias estrategias conocidas en la técnica para el transporte de moléculas a través de la barrera hemato-encefálica, incluyendo, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre, y métodos basados en receptores y canales.

**[0356]** Los métodos físicos para el transporte de un anticuerpo o inmunoconjugado a través de la barrera hemato-encefálica incluyen, pero sin limitación, sortear completamente la barrera hemato-encefálica o crear aberturas en la barrera hemato-encefálica. Los métodos para sortearla incluyen, pero sin limitación, la inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)), infusión intersticial/liberación mejorada por convección (véase, por ejemplo, Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)), y la implantación de un dispositivo de liberación en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos de creación de aberturas en la barrera incluyen, pero sin limitación, ultrasonidos (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos No. 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante la administración de manitol hipertónica (Neuwelt, E. A., Implication of la barrera hemato-encefálica and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización por, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizante A-7 (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206, y 5,686,416), y la transfección de neuronas que eluyen la barrera hemato-encefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos No. 2003/0083299).

**[0357]** Los métodos basados en lípidos para el transporte de un anticuerpo o inmunoconjugado a través de la barrera hemato-encefálica incluyen, pero sin limitación, la encapsulación del anticuerpo o inmunoconjugado en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hemato-encefálica (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patentes de Estados Unidos No. 20020025313), y el recubrimiento del anticuerpo o inmunoconjugado en partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, por ejemplo, Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 20040131692).

**[0358]** Los métodos basados en células madre para el transporte de un anticuerpo o inmunoconjugado a través de la barrera hemato-encefálica implica la modificación genética de células progenitoras neurales (NPCs) para expresar el anticuerpo o inmunoconjugado de interés y a continuación la implantación de las células madre en el cerebro del

individuo a tratar. Véase Behrstock et al. (2005) Gene Ther. 15 Dec. 2005 publicación online avanzada (que describe que las NPCs modificadas genéticamente para expresar el factor neurotrópico GDNF reducían los síntomas de la enfermedad de Parkinson cuando se implantaban en cerebros de modelos de roedores y primates).

5 **[0359]** Los métodos basados en receptores y canales para el transporte de un anticuerpo o inmunocóncugado a través de la barrera remato-encefálica incluyen, pero sin limitación, la utilización de bloqueadores de glucocorticoides para incrementar la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (véase, por ejemplo, las publicaciones de las solicitudes de patente de Estados Unidos Nos. 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); la activación de canales de potasio (véase, por ejemplo, publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0089473), la inhibición de transportes de fármacos ABC (véase, por ejemplo, publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0073713); recubrimiento de anticuerpos o inmunocóncugados con una transferrina y la modulación de la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0129186), y cationización de los anticuerpos o inmunocóncugados (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 5,004,697).

15 **[0360]** Los anticuerpos o inmunocóncugados de la presente invención se formularían, dosificarían o y administrarían de una manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno en particular en tratamiento, el mamífero en particular en tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el punto de liberación del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo o inmunocóncugado no necesita formularse, aunque opcionalmente se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad anticuerpo o inmunocóncugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descritos anteriormente. Éstos se utilizan en general en las mismas dosis y con las rutas de administración descritas aquí, o desde aproximadamente el 1 al 99% de las dosis descritas aquí, o en cualquier dosis y cualquier ruta que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

20 **[0361]** Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo o inmunocóncugado de la invención (cuando se utiliza solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo o inmunocóncugado, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunocóncugado se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunocóncugado, y el criterio del médico. El anticuerpo o inmunocóncugado se administra de manera adecuada al paciente de una vez o mediante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, 25 aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10mg/kg) de anticuerpo o inmunocóncugado puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantendría en general hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo o inmunocóncugado estaría en el intervalo desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. De este modo, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente recibe desde 30 aproximadamente dos hasta aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunocóncugado). Se puede administrar una dosis de carga inicial más elevada, seguido de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza 45 fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

### 3. Ensayos

55 **[0362]** Los anticuerpos anti-TAT226 e inmunocóncugados de la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

#### a) Ensayos de actividad

60 **[0363]** En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-TAT226 o inmunocóncugados de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular (por ejemplo, actividad "citotóxica"), o la capacidad de inducir la muerte celular, incluyendo la muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunocóncugados que tienen dicha actividad biológica in vivo y/o in vitro.

65 **[0364]** En ciertas realizaciones, se evalúa un anticuerpo anti-TAT226 o inmunocóncugado del mismo por su capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular in vitro. Son bien conocidos en la técnica los ensayos

para la inhibición del crecimiento o proliferación celular. Ciertos ensayos para proliferación celular, ejemplificados por los ensayos de "citólisis" descritos en la presente invención, miden la viabilidad celular. Uno de estos ensayos es el ensayo de viabilidad celular luminescente CellTiter-Glo™, que está disponible comercialmente en Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en un cultivo basado en la cuantificación del ATP presente, que es una indicación de células metabólicamente activas. Ver Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, patente de Estados Unidos No. 6602677. El ensayo puede realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible para cribado de alto rendimiento automatizado (HTS). Ver Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento del ensayo implica la adición de un sólo reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas. Esto da lugar a lisis celular y la generación de una señal luminiscente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Pueden registrarse los datos mediante un luminómetro o dispositivo de formación de imágenes de cámara de CCD. La salida de luminiscencia se expresa como unidades luminosas relativas (RLU).

**[0365]** Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo "MTT", un ensayo colorimétrico que mide la oxidación del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán mediante la reductasa mitocondrial. Como el ensayo de CellTiter-Glo™, este ensayo indica el número de células metabólicamente activas presentes en un cultivo celular. Ver, por ejemplo, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, y Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

**[0366]** En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-TAT226 por su capacidad de inducir la muerte celular in vitro. Los ensayos para la inducción de muerte celular son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, dichos ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de la integridad de la membrana tal y como se indica mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (ver Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11), o 7AAD. En un ensayo de captación de PI de ejemplo, se cultivan las células en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) complementado con FBS inactivado por calor al 10% (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. De este modo, se realiza el ensayo en ausencia de células del complemento y células efectoras inmunes. Las células se siembran a una densidad de  $3 \times 10^6$  por placa en platos de 100 x 20 mm y se deja que se unan durante toda la noche. Se extrae el medio y se sustituye por medio nuevo solo o medio que contiene varias concentraciones del anticuerpo o inmunoconjugado. Se incuban las células durante un periodo de tiempo de 3 días. Después del tratamiento, se lavan las monocapas con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación se centrifugan las células a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, se resuspende el pélet en 3 ml de tampón de unión de  $Ca^{2+}$  frío (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM,  $CaCl_2$  2,5 mM) y se alicuotan en tubos de 12 x 75 mm tapados con colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para extraer los grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Se analizan las muestras utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software CellQuest de FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). De este modo se identifican anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular tal y como se determina mediante la captación de PI.

**[0367]** En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-TAT226 o inmunoconjugado por su capacidad de inducir apoptosis (muerte celular programada) in vitro. Un ensayo de ejemplo para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo de unión a anexina. En un ensayo de unión a anexina de ejemplo, se cultivan células y se siembran en placas tal y como se explica en el párrafo anterior. Se extrae el medio y se sustituye con medio nuevo solo o medio que contiene de 0,001 a 10 µg/ml del anticuerpo o inmunoconjugado. Después de un periodo de incubación de tres días, se lavan las monocapas con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación se centrifugan las células, se resuspenden en tampón de unión de  $Ca^{2+}$ , y se alicuotan en tubos tal y como se explica en el párrafo anterior. A continuación los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo anexina V-FITC) (1 µg/ml). Se analizan las muestras utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software CellQuest de FACSCONVERT™ (BD Biosciences). De este modo se identifican anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina en comparación con el control. Otro ensayo de ejemplo para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico de ELISA para ADN de histona para detectar la degradación internucleosomal del ADN genómico. Dicho ensayo puede realizarse utilizando, por ejemplo, el kit de ELISA de Detección de Muerte Celular (Roche, Palo Alto, CA).

**[0368]** Las células para uso en cualquiera de los ensayos in vitro anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan de modo natural TAT226 o que han sido manipuladas para expresar TAT226. Dichas células incluyen células tumorales que sobreexpresan TAT226 en comparación con células normales del mismo origen tisular. Dichas células también incluyen líneas celulares (incluyendo líneas celulares tumorales) que expresan TAT226 y líneas celulares que no expresan de forma normal TAT226 pero que se han transfectado con ácido nucleico que codifica TAT226. Las líneas celulares de ejemplo proporcionadas en la presente invención para su uso en cualquiera de los ensayos in vitro anteriores incluyen la línea celular de cáncer ovárico humano OVCAR3, que expresa TAT226, y la línea celular de cáncer de colon humano HCT116 transfectada con ácido nucleico que codifica TAT226.

**[0369]** En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-TAT226 o inmunoconjugado del mismo por su capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular in vivo. En ciertas realizaciones, se evalúa un anticuerpo anti-TAT226 o inmunoconjugado del mismo según su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral in vivo. Pueden utilizarse para estas pruebas sistemas de modelo in vivo, tales como modelos de xenoinjerto. En un sistema de xenoinjerto de

ejemplo, se introducen células tumorales humanas dentro de un animal no humano inmunocomprometido, por ejemplo un ratón "desnudo" atímico. Se administra al animal un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmunoconjugado de inhibir o disminuir el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones del sistema de xenoinjerto anterior, las células tumorales humanas son células tumorales de un paciente humano. Dichos modelos de xenoinjerto están disponibles comercialmente en Oncotest GmbH (Frieburg, Alemania). En ciertas realizaciones, las células tumorales humanas son células de una línea celular tumoral humana, como las células OVCAR3, tal y como se ejemplifica en la presente invención. En ciertas realizaciones, se introducen las células tumorales humanas en un animal no humano adecuadamente inmunocomprometido mediante inyección subcutánea o mediante trasplante en un sitio adecuado, tal como una almohadilla adiposa mamaria.

b) Ensayos de unión y otros ensayos

**[0370]** En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-TAT226 por su actividad de unión a antígeno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se evalúa un anticuerpo anti-TAT226 por su capacidad de unirse a TAT226 expresado en la superficie de una célula. Para dicha evaluación puede utilizarse un ensayo FACS como el que se describe en el Ejemplo D.

**[0371]** En un aspecto, pueden utilizarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo monoclonal que compita con YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9 YWO.49.H2, o YWO.49.H6 por la unión con TAT226. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une mediante YWO. 32, YWO.49 YWO.49.B7, YWO.49.C9 YWO.49.H2, o YWO.49.H6. Los ensayos de competición de ejemplo incluyen, pero sin limitación, ensayos de rutina como aquellos proporcionados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Se proporcionan procedimientos de ejemplo detallados para localizar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro aproximadamente un 50% o más.

**[0372]** En un ensayo de competición de ejemplo, se incuba TAT226 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a TAT226 (por ejemplo, YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, o YWO.49.H6) y un segundo anticuerpo sin marcar que se evalúa por su capacidad de competir con el primer anticuerpo por unirse a TAT226. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba el TAT226 inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a TAT226, se elimina el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el TAT226 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el TAT226 inmovilizado se reduce substancialmente en la muestra evaluada en comparación con la muestra control, entonces esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por unirse a TAT226. En ciertas realizaciones, el TAT226 inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa TAT226 en su superficie.

**[0373]** En un aspecto, los anticuerpos anti-TAT226 purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y de exclusión de tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

**[0374]** En una realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas funciones efectoras pero no todas, que lo convierten en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque ciertas funciones efectoras (como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, se miden las actividades Fc del anticuerpo para asegurarse de que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de la unión a Fc $\gamma$ R (de ahí probablemente que carezca de actividad de ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fc $\gamma$ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinetic, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). En las Patentes de Estados Unidos n° 5.500.362 o 5.821.337 se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) y células asesinas naturales (NK). De modo alternativo, o adicional, puede evaluarse la actividad *in vivo* de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal como el que se describe en Clynes et al. *PNAS* (USA) 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C $_1$ q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C $_1$ q y de ahí la falta de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo tal y como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y purificación/semivida *in vivo* utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

## F. Artículos de fabricación

[0375] Se describe aquí un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunocóncugado de la invención. La etiqueta o prospecto indican que la composición se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un anticuerpo o inmunocóncugado de la presente invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un agente citotóxico adicional o cualquier otro agente terapéutico. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden utilizar para tratar una enfermedad particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

## IV. EJEMPLOS

[0376] A continuación, se indican ejemplos de los métodos y composiciones de la presente invención. Se entiende que se pueden realizar otras realizaciones, teniendo en cuenta la descripción general proporcionada anteriormente. Se proporcionan varios ejemplos para fines comparativos únicamente.

## A. Análisis de la expresión génica de TAT226

[0377] La expresión génica de TAT226 humano se analizó utilizando una base de datos privada que contiene la información de la expresión génica (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD). El análisis gráfico de la base de datos GeneExpress® se realizó utilizando un visor del perfil de "microarray". La figura 13 es una representación gráfica de la expresión génica de TAT226 en varios tejidos, que se indican a la izquierda. La escala a lo largo de la parte superior del gráfico indica los niveles de expresión génica en base a la intensidad de la señal de hibridación. Las transferencias (*blots*) aparecen tanto por encima como por debajo de la línea adyacente a cada tejido indicado. Las transferencias que aparecen por encima de la línea representan la expresión génica en tejido normal y las transferencias que aparecen por debajo de la línea representan la expresión génica en tumor o tejido enfermo. La figura 13 muestra una tendencia hacia el incremento de la expresión génica de TAT226 en tumor o tejidos enfermos en relación con sus homólogos normales. En particular, TAT226 muestra una sobreexpresión sustancial en ovario tumoroso y enfermo en relación con ovario normal y en tumor de Wilms en relación con el riñón de tumor. Otros tejidos que muestran la sobreexpresión en tumor o tejido enfermo en relación con el tejido normal incluyen tejido de endometrio, glándulas adrenales, huesos, pulmón, piel y tejido blando. Además, el TAT226 se expresa fuertemente en tejido de cerebro normal (tal como rinencéfalo, hipocampo y ganglios basales) y en tejido cerebral tumoroso o enfermo, tales como gliomas.

[0378] La base de datos GeneExpress® se utilizó para analizar la expresión génica de TAT226 humano en ovario normal; trompas de Falopio normal; cáncer de ovario de los subtipos de cistoadenocarcinoma de células claras, mucinoso y seroso; cáncer de ovario metastático; y otros tipos de cáncer de ovario. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 14, con los tipos de tejido particulares indicados bajo el gráfico. La escala en el eje  $\gamma$  del gráfico indica niveles de expresión génica en base a la intensidad de señal de hibridación. El cistoadenocarcinoma seroso y el cáncer de ovario metastático mostraron una fuerte sobreexpresión de TAT226 en relación a ovario normal. Los subtipos de células claras y mucinoso mostraron una expresión comparable con el ovario normal. Las trompas de Falopio normales también mostraron una expresión sustancial de TAT226. De manera destacada, el subtipo seroso de cáncer de ovario se asemeja mucho histológicamente al epitelio de las trompas de Falopio, y tanto el ovario como las trompas de Falopio derivan del mismo tejido embrionario. Véase Fox et al. (2002) "Pathology of epithelial ovarian cancer," en Ovarian Cancer capítulo. 9 (Jacobs et al., eds., Oxford University Press, New York)

## B. Generación de anticuerpos anti-TAT226

[0379] Los anticuerpos para TAT226 se generaron mediante el cribado de una biblioteca de expresión en fagos con una proteína de fusión "TAT226-His" recombinante que comprende los aminoácidos 1-115 de SEC ID NO:75 y una etiqueta de polihistidina C-terminal. La biblioteca de expresión en fagos era una biblioteca de (Fab')<sub>2</sub> sintéticos utilizando un sistema de Fab'-zip-fago. Véase Lee et al. (2004) J. Immunol. Methods 284:119-132. La biblioteca comprendía una biblioteca de HVR de cadena pesada en el armazón de la región variable de cadena pesada de

huMAb4D5-8 (véanse las figuras 5A y 5B, segundo aceptor "B," SEC ID NOs:50, 51, 57, 35) y una región variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 fijada tal como se muestra en la SEC ID NO:26. Los clones seleccionados utilizando la expresión en fagos se cribó contra TAT226-His utilizando ELISA de fagos (véase, por ejemplo, Sidhu et al. (2004) J. Mol. Biol. 338:299-310). Los clones YWO.32 y YWO.49 se seleccionaron para un análisis posterior.

[0380] Para mejorar la afinidad de YWO.49, se generaron bibliotecas de expresión en fagos en la base de YWO.49, con HVR-H3 y HVR-L3 reconocidos para una aleatorización suave, en que los residuos de aminoácidos seleccionados en las HVR designadas se mantuvieron constantes. Mientras otros se sometieron a mutagénesis. Los clones seleccionados se cribaron utilizando ELISA de fagos. Los anticuerpos madurados para afinidad designados como YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, y YWO.49.H6 se seleccionaron para un análisis posterior. Se determinaron las secuencias de nucleótidos y polipéptidos codificados de las regiones VH y VL de YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, y YWO.49.H6, tal como se muestra en las figuras 9 y 10. Las secuencias de HVR de cadena pesada y ligera de YWO.32, YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, y YWO.49.H6 se muestran en las figuras 2-4. Las secuencias consenso de HVR-H3 y HVR-L3 derivadas de YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, y YWO.49.H6 también se muestran en la figura 4. YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, y YWO.49.H6 se "reformatearon" como IgG de longitud completa mediante la inserción de fragmentos de Fab' sobre regiones constantes apropiadas utilizando técnicas recombinantes. Los experimentos descritos a continuación se realizaron utilizando los anticuerpos reformateados.

#### C. Caracterización de la afinidad de unión a antígeno recombinante

[0381] Se determinó la afinidad de unión de YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, y YWO.49.H6 para antígeno recombinante mediante la medición de resonancia de plasmones superficiales utilizando un sistema BIACORE® 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). En resumen, se activaron chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CMS, Biacore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. Se diluyó el anticuerpo Anti-TAT226 hasta 5 µg/ml con 10 mM de acetato de sodio, pH 4,8, antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para obtener aproximadamente 500 unidades de respuesta (RU) de anticuerpo acoplado. A continuación, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de TAT226-His (0,7 nM hasta 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% a 25°C con una velocidad de flujo de 25 µl/min. Se calcularon las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y de disociación ( $k_{off}$ ) utilizando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (Software BIAevaluation versión 3.2). Se calculó la constante de disociación en equilibrio (Kd) como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ . Los resultados de este experimento se muestran a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

Clon	$k_{on}/10^5$	$K_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)
YWO.49	0,074	3,49	47,16
YWO.49.B7	0,27	<0,05	<0,18
YWO.49.C9	1,53	<0,05	<0,03
YWO.49.H2	0,22	0,05	0,23
YWO.49.H6	1,86	0,09	0,05

#### D. Caracterización de unión de anticuerpo a TAT226 de superficie celular

[0382] Se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-TAT226 de unirse a TAT226 expresado en la superficie de OVCAR3, una línea celular de cáncer de ovario humano. Se realizó la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en las células OVCAR3 en ausencia y en presencia de YWO.49, YWO.49.B7, YWO.49.C9, YWO.49.H2, o YWO.49.H6. En resumen, se incubaron las células separadas con anticuerpo primario 5 µg/ml durante 1 hora en hielo, se lavaron, y se incubaron con anticuerpo secundario (IgG antihumano conjugado a ficoeritrina) durante 30 minutos en hielo. Se realizó FACS utilizando un citómetro de flujo FACScan™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

[0383] Los resultados de los análisis FACS para YWO.49, YWO.49.H2, y YWO.49.H6 se muestran en la Figura 15. Los picos en el lado izquierdo de cada gráfico representan la unión "de base", es decir, la unión de anticuerpo secundario solo. Los picos en el lado derecho de cada gráfico representan la unión del anticuerpo anti-TAT226 indicado. YWO.49.B7 no se unió significativamente a células OVCAR3 mediante FACS, aún cuando se unió a antígeno recombinante con una Kd dentro del intervalo de Kds observado para YWO.49 y los otros anticuerpos madurados para afinidad (ver resultados de análisis BIACOREO, tabla 2 anterior). La unión de YWO.49.C9 fue comparable a la observada para YWO.49.H2 y YWO.49.H6.

#### E. Caracterización de la afinidad de unión a antígeno de superficie celular

[0384] Se examinó la afinidad de unión de YWO.49.H2 y YWO.49.H6 para TAT226 expresada en la superficie de células OVCAR3 utilizando un ensayo de competición. En resumen, se dejó que YWO.49.H2 o YWO.49.H6 marcados (yodados) se uniera a las células OVCAR3 en presencia de anticuerpo sin marcar. Se determinó la afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la metodología de análisis de Scatchard descrita inicialmente en

Munson et al., Anal. Biochem. 107:220 (1980). Los resultados de este experimento se muestran a continuación en la Tabla 3.

TABLA 3

Clon	Kd (nM)
YWO.49.H2	0,348
YWO.49.H6	0,404

5 **[0385]** La Kd de YWO.49.H2 y YWO.49.H6 es más alto para TAT226 expresado en la superficie de células OVCAR3 en comparación con TAT226-His recombinante (comparar Kds para YWO.49.H2 y YWO.49.H en las tablas 2 y 3), que indican que YWO.49.H2 y YWO.49.H6 se unen con una afinidad ligeramente mayor a TAT226-His recombinante que a TAT226 en la superficie de las células OVCAR3.

#### 10 F. ARNm y expresión de la proteína de TAT226

15 **[0386]** Se analizó la expresión de ARNm de TAT226 en células OVCAR3 y en un panel de muestras de cáncer de ovario utilizando un ensayo de 5' nucleasa (TaqMan®) y PCR cuantitativa a tiempo real. Las muestras de cáncer de ovario, designadas como "HF ####" en la figura 16, eran secciones de tejido congelado. Se aisló el ARN de las secciones de tejido, se amplificó utilizando el kit Message Amp II de Ambion (Ambion, Austin, TX), y se transcribió de forma inversa en ADNc. Se aisló el ARN de las células OVCAR3 y se transcribió de forma inversa en ADNc. El ADNc de TAT226 se amplificó mediante PCR a tiempo real en presencia de una sonda informadora no extendible específica para el producto de amplificación. Se determinó el ciclo umbral o "Ct" (el ciclo en el que la señal generada de la separación de la sonda informadora supera la señal de fondo) y se utilizó para calcular los niveles iniciales de ARNm de TAT226. El nivel de ARNm de TAT226 en el panel de muestras de cáncer de ovario se expresó en relación al nivel de ARNm de TAT226 en células OVCAR3, tal como se muestran en el gráfico de barras en la figura 16.

25 **[0387]** Se analizó la expresión de proteína TAT226 en células OVCAR3 y en el panel anterior de muestras de cáncer de ovario utilizando inmunohistoquímica (IHC) de la siguiente manera. Se fijaron secciones de tejido (congeladas o bañadas en parafina) de las muestras de cáncer de ovario durante 5 minutos en acetona/etanol. A continuación, las secciones se lavaron en PBS se bloquearon con avidina y biotina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) durante 10 minutos cada vez y se lavaron de nuevo en PBS. A continuación, las secciones se bloquearon con suero al 10% durante 20 minutos y se transfirieron para eliminar el exceso. A continuación, se añadió un anticuerpo primario (YWO.49.H2 o YWO.49.H6) a las secciones a una concentración de 10 µg/ml durante 1 hora. A continuación, las secciones se lavaron en PBS. Se añadió un anticuerpo secundario biotinilado a las secciones durante 30 minutos y a continuación se lavaron las secciones con PBS. A continuación, las secciones se expusieron a los reactivos del kit Vector ABC (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) durante 30 minutos y, a continuación, se lavaron en PBS. A continuación, las secciones se expusieron a diaminobencidina (Pierce) durante 5 minutos y a continuación se lavaron en PBS. A continuación, las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer, se cubrieron con un portaobjetos y se visualizaron. El IHC se realizó sobre células OVCAR3 utilizando el mismo protocolo, a excepción de que las células se pusieron en primer lugar como pélets, se congelaron y a continuación se seccionaron. A continuación, las secciones se sometieron al protocolo anterior.

40 **[0388]** Los resultados se describen cualitativamente en la figura 16 con niveles de expresión clasificados como "-", "+/-", o "+". En general, hubo una correlación global entre el nivel de expresión de ARNm de TAT226 y la expresión de proteína TAT226 en la superficie de células OVCAR3. Los experimentos de IHC también confirmaron que los anticuerpos reconocieron TAT226 en la superficie celular. La histología de cada célula en el panel de células de cáncer de ovario también se describe en la figura 16 con la abreviatura "adenoca" que indica "adenocarcinoma".

#### 45 G. Producción de ADC anti-TAT226

50 **[0389]** Se produjeron ADC anti-TAT226 conjugando YWO.49.H2 e YWO.49.H6 a los siguientes grupos enlazadores de fármaco: MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; y MC-MMAF, que se representan anteriormente en la Sección III.C.1.b.2. Antes de la conjugación, los anticuerpos se redujeron parcialmente con TCEP utilizando métodos estándar según la metodología descrita en WO 2004/010957 A2. Los anticuerpos parcialmente reducidos se conjugaron con los grupos enlazadores de fármaco utilizando métodos estándar según la metodología descrita en Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 y US 2005/0238649 A1. En resumen, los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con los grupos enlazadores de fármaco para permitir la conjugación de los grupos a residuos de cisteína. Las reacciones de conjugación se detuvieron y se purificaron los ADC. La carga de fármaco (número promedio de grupos farmacológicos por anticuerpo) para cada ADC se determinó mediante HPLC de la siguiente manera:

ADC	Carga de fármaco
YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAE	3,8
YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAF	4,7
YWO.49.H2-MC-MMAF	4,9
YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE	4,4
YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF	4,4
YWO.49.H6-MC-MMAF	4,1

#### H. Ensayos de citólisis

5 **[0390]** Se analizaron conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) por la capacidad de inhibir la proliferación de células que expresan AT226 en los siguientes ensayos de citólisis *in vitro* e *in vivo*:

##### 1. Ensayo de citólisis *in vitro* de OVCAR3

10 **[0391]** Se analizaron YWO.49.H2 e YWO.49.H6 ADCs por la capacidad de inhibir la proliferación de células OVCAR3. Las células OVCAR3 se sembraron en placas de 96 pocillos en RPMI con FBS al 20%. Las células OVCAR3 de una densidad de 3000 células por pocillo se incubaron con concentraciones variantes de los ADC, tal como se muestra en la figura 17. El anticuerpo anti-MUC<sub>16</sub>/CA125 conjugado a MC-vc-PAB-MMAE se utilizó como control positivo. MUC<sub>16</sub>/CA125 es un antígeno de cáncer de ovario conocido. Véase, por ejemplo, Yin et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:27371-27375. El anticuerpo anti-IL-8 conjugado a MC-vc-PAB-MMAE se utilizó como control negativo. Después de 5 días de incubación, se midió la viabilidad celular utilizando el Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™ (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. La escala en el eje  $\gamma$  de la figura 17 indica las unidades luminosas relativas o "RLU" de la luminiscencia de luciferasa, que es una medida de la viabilidad celular.

20 **[0392]** La figura 17 muestra que, similar al control positivo, YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAF y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF presentaban una actividad de citólisis destacada, particularmente a concentraciones de 0,01 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$  y alrededor de las mismas. YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAE y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE también presentaban actividad de citólisis, pero en un grado menor que la observada con YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAF y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF. La IC<sub>50</sub> para YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAF y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF fue de aproximadamente 0,005 nM, y la IC<sub>50</sub> para YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAE y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE fue de aproximadamente 0,2 nM. La IC<sub>50</sub> para MMAE libre fue de aproximadamente 0,1 nM. YWO.49.H2-MC-MMAF y YWO.49.H6-MC-MMAF no demostraron una actividad citolítica significativa en este ensayo. En este sistema de ensayo particular, cabe indicar que a concentraciones elevadas de ADC, incluyendo ADC de control negativo, la viabilidad celular disminuye sustancialmente debido a la concentración global elevada de MMAE y MMAF.

##### 2. Ensayo de citólisis *in vitro* utilizando células transfectadas HCT116

35 **[0393]** Se evaluaron los ADC de YWO.49.H2 y YWO.49.H6 por su capacidad de inhibir la proliferación de células HCT116, una línea celular de cáncer de colon, que ha sido transfectada de manera estable con ácido nucleico que codifica TAT226 humano. Las células HCT116 no transfectadas son normalmente aproximadamente 5-6 veces menos sensibles a MMAE libre (no conjugado) que a células OVCAR3.

40 **[0394]** En resumen, se transfectaron células HCT116 tal y como se indica a continuación. Se construyó un ácido nucleico que codificaba el TAT226 humano marcado con epítipo en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El epítipo etiqueta consistía en los aminoácidos 1-53 de la glicoproteína D (la etiqueta "gD") del virus del herpes simplex de tipo 1, que sustituyó la secuencia señal de los aminoácidos 1-22 en el N-terminal del TAT226 humano. Se transfectó el vector recombinante en las células HCT116 utilizando Lipofectamine200 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se cultivaron las células HCT116 transfectadas en medio 5A de McCoy con FBS al 10% y G418 0,4 mg/ml. Se tiñeron las células utilizando anticuerpos anti-gD y se clasificaron mediante FACS para seleccionar clones individuales que expresan la proteína de fusión gD:TAT226 humano recombinante. Se seleccionó uno de los clones, designado como HCT116#9-4, para un análisis posterior.

50 **[0395]** Para realizar el ensayo de citólisis, se sembraron células HCT116#9-4 en placas de 96 pocillos. Se incubaron células HCT116#9-4 a una densidad de 1000 células por pocillo con concentraciones variables de los ADC, tal y como se muestra en la Figura 18. Se utilizó el anticuerpo anti-gp120 conjugado a MC-vc-PAB-MMAE como control negativo. Después de 3 días de incubación, se midió la viabilidad celular utilizando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo™ (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 **[0396]** La Figura 18 muestra que YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAF y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF presentaban una actividad citolítica destacada, particularmente a aproximadamente 0,01  $\mu\text{g/ml}$  y hasta las concentraciones más altas probadas. La IC<sub>50</sub> para YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAF y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF fue de

aproximadamente 0,05 nM, y la IC<sub>50</sub> para MMAE libre fue de aproximadamente 0,9 nM. YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAE y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE no tuvieron actividad citolítica sustancial en relación con el control negativo en este ensayo en particular. La diferencia entre la actividad citolítica de YWO.49.H2-MC-vc-PAB-MMAE y YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE en este ensayo en comparación con el ensayo de citólisis de OVCAR3 (anteriormente) puede atribuirse a una variedad de factores, por ejemplo, la densidad celular y/o diferencias en la sensibilidad de fármaco.

**[0397]** Cabe indicar que para algunas otras líneas celulares evaluadas que normalmente expresan ARNm o proteína de TAT226, los ADC de YWO.49.H2 y YWO.49.H6 no mostraron actividad citolítica significativa. Esto puede deberse a varios factores, por ejemplo, efectos específicos del tipo de célula, niveles de la expresión de TAT226 en la superficie celular, y/o diferencias en la sensibilidad de fármaco.

### 3. Ensayo in vivo utilizando xenoinjerto de HCT116#9-4

**[0398]** Se utilizó un modelo de xenoinjerto in vivo para evaluar el YWO.49.H6 conjugado y no conjugado por la capacidad de inhibir la proliferación de las células tumorales que expresan TAT226 in vivo. Se indujeron tumores en ratones "nu-nu" desnudos atímicos mediante inyección subcutánea de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células HCT116#9-4 en los flancos dorsales de los ratones. Se dejó que crecieran los tumores hasta que alcanzaron un volumen de tumor promedio de 200 mm<sup>3</sup>. Ese punto de tiempo fue designado como "día 0." Tal y como se muestra en la Figura 19, los ratones recibieron inyecciones intravenosas de 3 mg/kg de los anticuerpos no conjugados indicados o ADC en los días 0, 7 y 16. Los anticuerpos (Ab) anti-artemisa conjugados y no conjugados sirvieron como controles negativos. Se midió el volumen del tumor promedio en los días 3, 7, 10, 16, y 21. Tal y como se muestra en la Figura 19, YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF mostró actividad citolítica tumoral significativa, tal y como se mide mediante el volumen de tumor promedio, en comparación con Ab-MC-vc-PAB-MMAF anti-artemisa en este modelo concreto de xenoinjerto. YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE no mostró actividad citolítica tumoral significativa en relación con Ab-MC-vc-PAB-MMAE anti-artemisa en este modelo de xenoinjerto. No obstante, este modelo de xenoinjerto puede no reflejar la actividad citolítica de YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE observada in vitro por varios factores, por ejemplo, debido a diferencias en la sensibilidad de fármaco o los niveles de expresión de TAT226 en superficie celular en el microentorno del tumor de xenoinjerto.

### 4. Otros modelos de xenoinjerto

**[0399]** Pueden utilizarse otros modelos de xenoinjerto para evaluar anticuerpos anti-TAT226 conjugados y no conjugados según su capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales que expresan TAT226 in vivo. Por ejemplo, pueden proporcionarse modelos de xenoinjertos para tumores de ovario y cerebro por fuentes públicas como Oncotest GmbH (Frieberg, Alemania) y Southern Research Institute (Birmingham, AL). Los modelos Oncotest en concreto se desarrollaron mediante el crecimiento de tumores de pacientes en ratones desnudos inmunodeficientes. Los xenoinjertos que expresan ARNm y/o proteína de TAT226 pueden ser útiles para demostrar la actividad citolítica de anticuerpos anti-TAT226 in vivo.

**[0400]** Se evaluó YWO.49.H6 conjugado en el modelo Oncotest OVXF1023 por su capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales de ovario in vivo. El modelo de Oncotest OVXF1023 se deriva de un carcinoma de ovario adenomatoso seroso papilar escasamente diferenciado metastatizado, estadio M1. Se trataron los ratones de OVXF1023 con los ADC indicados en la Figura 20. En la Figura 20, YWO.49.H6 se designa como "H6"; el anticuerpo anti-artemisa (control) se designa como "RW"; y el enlazador -MC-vc-PAB- se abrevia como "vc." Se administraron los ADC en los días y en las concentraciones indicadas en la Figura 20. Los resultados mostrados en la Figura 20 indican que YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF y YWO.49.H6-MC-MMAF redujeron significativamente el volumen tumoral en comparación con los otros ADC.

**[0401]** Se repitió el experimento anterior con OVXF1023 bajo condiciones similares pero con cambios en la dosificación y en los ADC de control. En el experimento de repetición, se trató a los ratones con una dosis más alta (5 mg/kg) de YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE y con dosis más bajas de (5 mg/kg) de YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAF y YWO.49.H6-MC-MMAF. Los resultados demostraron que los ADC H6 (y en concreto YWO.49.H6-MC-vc-PAB-MMAE) mostraron un volumen tumoral reducido en comparación con sus ADC de control respectivos (anti-gp120-MC-vc-PAB-MMAE a 6,4 mg/kg; anti-gp120-MC-vc-PAB-MMAF a 7,2 mg/kg; y anti-gp120-MC-MMAF a 5,4 mg/kg), aunque la diferencia en eficacia entre los ADC de H6 y sus ADC de control respectivos no fue estadísticamente significativa para algunos puntos de datos. (Datos no mostrados.) La diferencia entre estos resultados y los resultados obtenidos en el primer experimento de OVXF1023 puede atribuirse a las diferencias en la dosificación de los ADC H6 y la observación de que los ADC anti-gp120 de control mostraron una actividad inesperada en la reducción del volumen tumoral.

**[0402]** Adicionalmente, también se evaluaron los ADC H6 en otro modelo de Oncotest, OVXF899, que se deriva de un carcinoma de ovario seroso papilar moderadamente diferenciado (tumor primario). Los ADC H6 no redujeron el volumen tumoral en este modelo. (Datos no mostrados.) No obstante, este modelo concreto de Oncotest mostró una baja expresión de TAT226, que puede justificar los resultados observados.

I. TioMAbs

5 [0403] Se crearon anticuerpos manipulados con cisteína, o "TioMAbs," en que se sustituyó un residuo seleccionado de YWO.49.H6 por cisteína con el objetivo de proporcionar un sitio adicional para la conjugación de un grupo farmacológico-enlazador. Específicamente, se realizó una sustitución de A118C (numeración UE) en la cadena pesada de YWO.49.H6, o se realizó una sustitución de V205C (numeración Kabat) en la cadena ligera de YWO.49.H6. A continuación, se conjugó el tioMAb de A118C resultante con MC-MMAF, y el tioMAb de V205C resultante se conjugó a continuación con MC-MMAF o MC-vc-PAB-MMAE. Todos los tioMAbs eran capaces de unirse a células OVCAR3 mediante análisis de FACS. (Datos no mostrados.)

10

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo monoclonal que se une a TAT226, donde el anticuerpo comprende

- 5 (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4;  
 (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5;  
 (3) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 7-10;  
 (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12;  
 10 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y  
 (6) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 15-18,

donde dicho anticuerpo que se une a TAT226 tiene una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $\leq 10$  nM.

2. Anticuerpo monoclonal que se une a TAT226, donde el anticuerpo comprende (a), (b), (c) o (d):

15 (a)

- (1) una HVR -H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4;  
 (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5;  
 20 (3) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7;  
 (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12;  
 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13; y  
 (6) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 15

25 (b)

- (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4;  
 (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5;  
 (3) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8;  
 30 (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12;  
 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y  
 (6) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16

35 (c)

- (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4;  
 (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5;  
 (3) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9;  
 40 (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12;  
 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13; y  
 (6) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 17

(d)

- 45 (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:4;  
 (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:5;  
 (3) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10;  
 (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:12;  
 50 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:13; y  
 (6) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18.

3. Anticuerpo según la reivindicación 2(c).

4. Anticuerpo según la reivindicación 2(d).

55 5. Anticuerpo según la reivindicación 2, que comprende además por lo menos un armazón seleccionado entre el armazón consenso del subgrupo III de VH y un armazón consenso del subgrupo I de VL.

60 6. Anticuerpo monoclonal que se une a TAT226, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:22-25 y un dominio variable de cadena ligera que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO:27-30, y donde dicho anticuerpo que se une a TAT226 tiene una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $\leq 10$  nM.

65 7. Anticuerpo según la reivindicación 6, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:24 y un

dominio variable de cadena ligera que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:29.

5 8. Anticuerpo según la reivindicación 7, donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:24, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:29.

10 9. Anticuerpo según la reivindicación 6, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:25 y un dominio variable de cadena ligera que tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:30.

15 10. Anticuerpo según la reivindicación 9, donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:25, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:30.

11. Anticuerpo según la reivindicación 1, 2 ó 6, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')<sub>2</sub>.

20 12. Anticuerpo según la reivindicación 1, 2 ó 6, donde el anticuerpo es humanizado.

13. Anticuerpo según la reivindicación 1, 2 ó 6, donde el anticuerpo es humano.

25 14. Inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a TAT226 tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, unido covalentemente a un agente citotóxico.

15. Inmunoconjugado según la reivindicación 14, donde el agente citotóxico se selecciona entre una toxina, un agente quimioterapéutico, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.

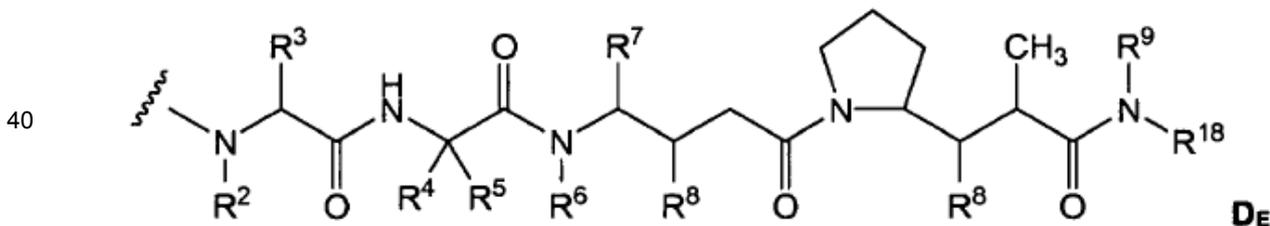
30 16. Inmunoconjugado que tiene la fórmula Ab-(L-D)<sub>p</sub>, donde:

(a) Ab es un anticuerpo monoclonal tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;

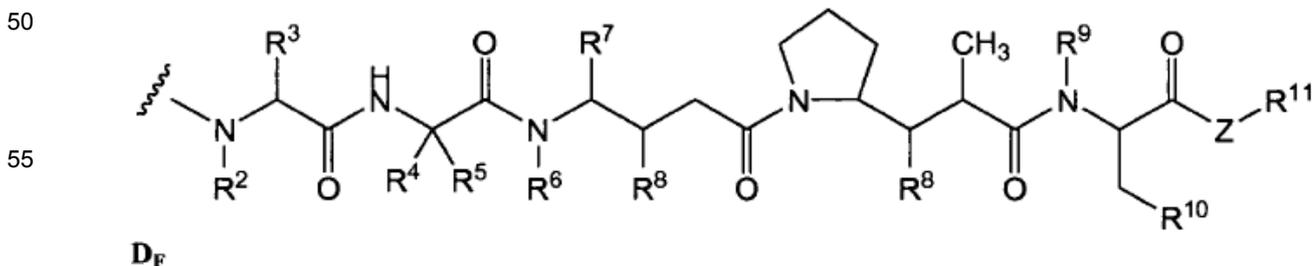
(b) L es un enlazador;

(c) D es un fármaco de fórmula D<sub>E</sub> o D<sub>F</sub>

35



45



60 y donde R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es -H o metilo, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OH, y H; R<sup>9</sup> es H; R<sup>10</sup> es arilo; Z es -O- o -NH-; R<sup>11</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>; y R<sup>18</sup> es -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arilo; y

65 (d) p varía desde aproximadamente 1 a 8.

17. Inmunoconjugado según la reivindicación 16, donde el enlazador está unido al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.

18. Inmunoconjugado según la reivindicación 16, donde el fármaco se selecciona entre MMAE y MMAF.

19. Inmunoconjugado según la reivindicación 18, donde el fármaco es MMAE.

20. Inmunoconjugado según la reivindicación 18, donde el fármaco es MMAF.

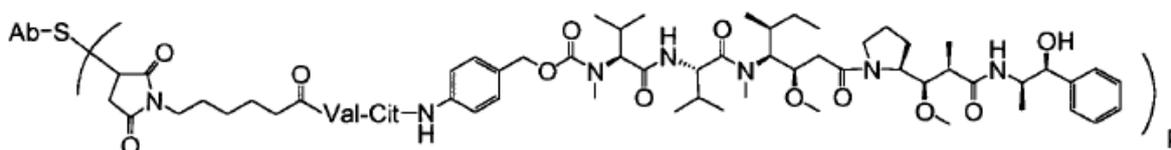
21. Inmunoconjugado según la reivindicación 18, donde el enlazador es separable por una proteasa.

22. Inmunoconjugado según la reivindicación 21, donde el enlazador comprende a dipéptido val-cit

23. Inmunoconjugado según la reivindicación 21 donde el enlazador comprende una unidad p-aminobencilo.

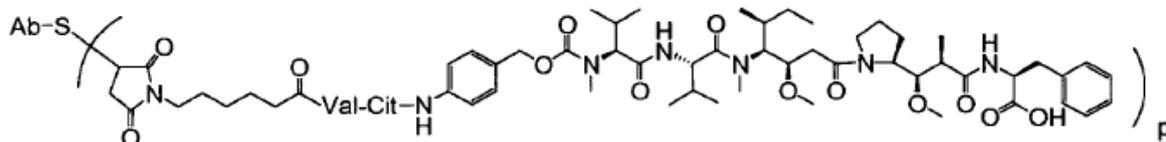
24. Inmunoconjugado según la reivindicación 21, donde el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo.

25. Inmunoconjugado según la reivindicación 19, donde el inmunoconjugado tiene la fórmula



donde S es un átomo de azufre, y p varía de 2 a 5.

26. Inmunoconjugado según la reivindicación 20, donde el inmunoconjugado tiene la fórmula



donde S es un átomo de azufre, y p varía de 2 a 5.

27. Composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26 para utilizar en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular.

28. Composición farmacéutica según la reivindicación 27, donde el trastorno proliferativo celular se selecciona entre cáncer de ovario, cáncer de útero, tumor de cerebro y tumor de Wilms.

29. Utilización de un inmunoconjugado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular.

30. Utilización según la reivindicación 29, donde el trastorno proliferativo celular se selecciona entre cáncer de ovario, cáncer de útero, tumor de cerebro y tumor de Wilms.

31. Inmunoconjugado según la reivindicación 25, donde Ab es un anticuerpo monoclonal tal como se define en la reivindicación 2(c) o la reivindicación 8.

32. Inmunoconjugado según la reivindicación 25, donde Ab es un anticuerpo monoclonal tal como se define en la reivindicación 2(d) o la reivindicación 10.

33. Inmunoconjugado según la reivindicación 26, donde Ab es un anticuerpo monoclonal tal como se define en la reivindicación 2(c) o la reivindicación 8.

34. Inmunoconjugado según la reivindicación 26, donde Ab es un anticuerpo monoclonal tal como se define en la reivindicación 2(d) o la reivindicación 10.

Figura 1

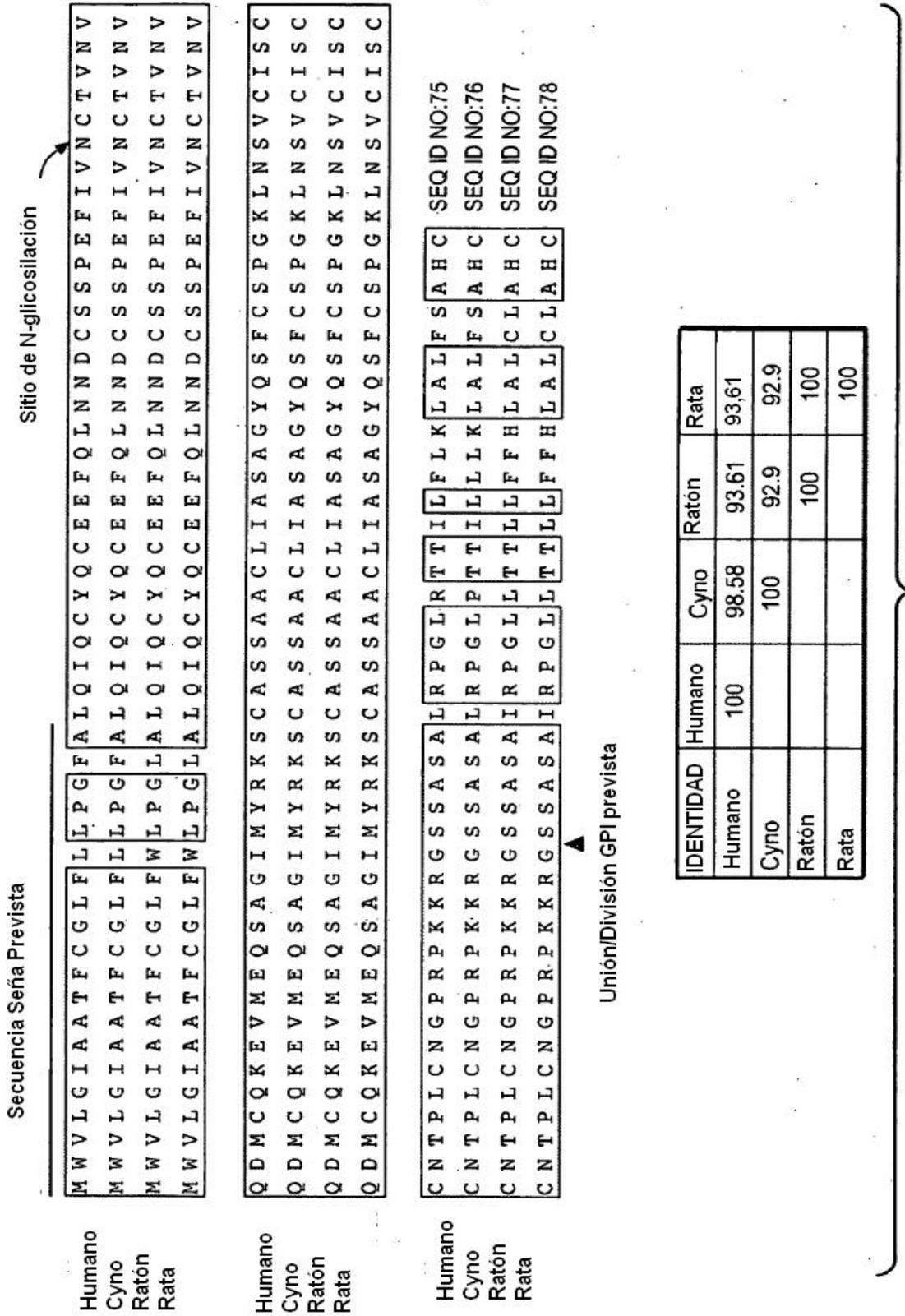


Figura 2

Secuencias HVR-H1 **YWO.32** y **YWO.49**

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat												
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35			
YWO.32	1	G	F	T	I	S	S	S	S	I	H			
YWO.49	4	G	F	T	I	T	N	Y	G	I	H			

Secuencias HVR-H2 - **YWO.32** y **YWO.49**

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat																	
		49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
YWO.32	2	A	R	I	T	P	S	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
YWO.49	5	G	R	I	Y	P	D	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

Secuencias HVR-H3 - **YWO.32** y **YWO.49**

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat												
		95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	101	102
YWO.32	3	C	I	L	C	F	G	P	L	W	A	M	D	Y
YWO.49	6	K	L	W	V	S	R	A	G			M	D	Y

Figura 3

Secuencias HVR-H1 **YWO.32** y **YWO.49**

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat																			
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40					
YWO.32	1	G	F	T	I	S	S	S	S	I	H										
YWO.49	4	G	F	T	I	T	N	Y	G	I	H										

Secuencias HVR-H2 - **YWO.32** y **YWO.49**

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat																																			
		49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75								
YWO.32	2	A	R	I	T	P	S	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G																		
YWO.49	5	G	R	I	Y	P	D	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G																		

Secuencias HVR-H3 - **YWO.32** y **YWO.49**

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat											
		95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	101
YWO.32	3	C	I	L	C	F	G	P	L	W	A	D	Y
YWO.49	6	K	L	W	V	S	R	A	G		M	D	Y

Figura 4

Secuencias HVR-H3 - YWO.49 y anticuerpos madurados para afinidad derivados de YWO.49

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat										
		95	96	97	98	99	100	100A	100B	100E	101	102
YWO.49	6	K	L	W	V	S	R	A	G	M	D	Y
YWO.49.B7	7	K	L	W	V	S	L	A	A	M	D	Y
YWO.49.C9	8	K	L	W	V	T	L	A	S	M	D	Y
YWO.49.H2	9	K	L	W	V	S	L	A	P	M	D	Y
YWO.49.H6	10	K	L	W	I	S	I	A	G	M	D	Y
consenso	11	K	L	W	V/I	S/T	R/L/I	A	G/A/S/P	M	D	Y

Secuencias HVR-L3 - YWO.49 y anticuerpos madurados para afinidad derivados de YWO.49

Clon #	SEQ ID NO:	Número Kabat									
		89	90	91	92	93	94	95	96	97	
YWO.49	14	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	
YWO.49.B7	15	Q	R	S	V	F	T	P	P	A	
YWO.49.C9	16	Q	K	S	Y	N	T	P	P	T	
YWO.49.H2	17	Q	Q	S	Y	G	T	P	F	I	
YWO.49.H6	18	Q	H	S	Y	A	T	P	F	T	
consenso	19	Q	R, K, H, N, Q (cualquier residuo basico)	S	Y/V	T/F/N/G/A	T	P	P/F	T/I/A	

Figura 5A

		F1		F2			
I	A	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	-HI-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	RVT	
	B	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVT	
	C	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVT	
	D	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVT	
II	A	QVQLQESGGPLVKPSQTLSTLTCTVSGGSVS	-HI-	WI RQPPGKGLEW I G	-H2-	RVT	
	B	QVQLQESGGPLVKPSQTLSTLTCTVS	-HI-	WI RQPPGKGLEW I	-H2-	RVT	
	C	QVQLQESGGPLVKPSQTLSTLTCTVS	-HI-	WI RQPPGKGLEW I	-H2-	RVT	
	D	QVQLQESGGPLVKPSQTLSTLTCTVS	-HI-	WI RQPPGKGLEW I	-H2-	RVT	
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V S	-H2-	RFT	
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	
	Aceptor						
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEW V S	-H2-	RFT	
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	
	Segundo aceptor						
	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEW V S	-H2-	RFT	
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEW V	-H2-	RFT	

Figura 5B

F3		F4		SEQ ID NOS OF F1, F2, F3, F4
I T A D T S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 32, 33, 34, 35	
I T A D T S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 36, 37, 34, 35	
I T A D T S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 36, 37, 38, 35	
I T A D T S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 36, 37, 39, 35	
I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 40, 41, 42, 35	
I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 43, 44, 42, 35	
I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 43, 44, 45, 35	
I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 43, 44, 46, 35	
I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 47, 48, 49, 35	
I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 49, 35	
I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 52, 35	
I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 53, 35	
I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 54, 48, 55, 35	
I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 55, 35	
I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 56, 35	
I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 54, 48, 57, 35	
I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 57, 35	
I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 58, 35	
I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	-H3-	W G Q G T L V T V S S	SEQ ID NO.: 50, 51, 59, 35	

Figura 6A

	F1	F2	F3
KV1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	-L1- WYQOKPGKAPKLLIY	-L2- GVPSRFSGGSGGTDFTLTISSLQP
KV2	DIVMTQSPPLSLPVPTEPASPISCS	-L1- WYLOKPGQSPQLLIY	-L2- GVPDRFSGGSGGTDFTLKISRVEA
KV3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	-L1- WYQOKPGQAPRLLIY	-L2- GIPDRFSGGSGGTDFTLTISRLEP
KV4	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC	-L1- WYQOKPGQPPKLLIY	-L2- GVPDRFSGGSGGTDFTLTISSLQA

Figura 6B

	<b>SEQ ID NOS OF</b>
	<b>F1, F2, F3, F4</b>
	<b>F4</b>
EDFATYYC [L3-] FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 60, 61, 62, 63
EDVGVYYC [L3-] FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 64, 65, 66, 63
EDFAVYYC [L3-] FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 67, 68, 69, 63
EDVAVYYC [L3-] FGQGTKVEIK	SEQ ID NO.: 70, 71, 72, 63

Figura 7

Secuencias armazón de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1      <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO:60)
- LC-FR2      <sup>36</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> (SEQ ID NO:61)
- LC-FR3      <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup> (SEQ ID NO:73)
- LC-FR4      <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEQ ID NO:63)

Secuencias armazón de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1      <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEQ ID NO:50)
- HC-FR2      <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> (SEQ ID NO:51)
- HC-FR3      <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> (SEQ ID NO:59)
- HC-FR4      <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEQ ID NO:35)

Figura 8

Secuencias armazón de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 modificadas en las posiciones 66 y 99 (subrayadas)

- LC-FR1      <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO:60)
- LC-FR2      <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> (SEQ ID NO:61)
- LC-FR3      <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup> (SEQ ID NO:62)
- LC-FR4      <sup>98</sup>Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEQ ID NO:74)

Secuencias armazón de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 modificadas en las posiciones 71,73 y 78 (subrayadas)

- HC-FR1      <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEQ ID NO:50)
- HC-FR2      <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> (SEQ ID NO:51)
- HC-FR3      <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn<sup>83</sup> Ser<sup>83a</sup> Leu<sup>83b</sup> Arg<sup>83c</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> (SEQ ID NO:53)
- HC-FR4      <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEQ ID NO:35)

Figura 9

Secuencias de la región variable de cadena pesada

Clon	SEQ ID NO	Secuencia
32	20	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSIHWVVRQAPGKGLEWVARI</u> <u>TPSDGTTYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARCILCFGPLWAMDYWGQGLLVTVSS</u>
49	21	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITNYGIHWVVRQAPGKGLEWVGRIPD</u> <u>SGATYYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARKLWVSRAGMDYWGQGLLVTVSS</u>
49 . B7	22	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITNYGIHWVVRQAPGKGLEWVGRIPD</u> <u>SGATYYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARKLWVSLAAMDYWGQGLLVTVSS</u>
49 . C9	23	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITNYGIHWVVRQAPGKGLEWVGRIPD</u> <u>SGATYYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARKLWVTLASMDYWGQGLLVTVSS</u>
49 . H2	24	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITNYGIHWVVRQAPGKGLEWVGRIPD</u> <u>SGATYYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARKLWVSLAPMDYWGQGLLVTVSS</u>
49 . H6	25	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITNYGIHWVVRQAPGKGLEWVGRIPD</u> <u>SGATYYADS</u> <u>VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARKLWISLAIAGMDYWGQGLLVTVSS</u>

Figura 10

Secuencias de la región variable de cadena ligera

Clon	SEQ ID NO	Secuencia
32, 49, y huMab4D5-8 "modificado"	26	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
49.B7	27	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRSVFTPPAFGGQGTKVEIKR
49.C9	28	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKSYNTPPPTFGQGTKVEIKR
49.H2	29	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYGTPPFI FGQGTKVEIKR
49.H6	30	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSYATPPTFGQGTKVEIKR
huMab4D5 - 8	31	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GRRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR

Figura 11

Alineación de las regiones variables de cadena pesada

Kabat No.	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			
YW0.32	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	S	S	S	I	H	W	V	R	Q	A				
YW0.49	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	T	N	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A			
YW0.49.B7	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	T	N	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A			
YW0.49.C9	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	T	N	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A			
YW0.49.H2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	T	N	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A			
YW0.49.H6	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	T	N	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A			
Kabat No.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78					
YW0.32	P	G	K	G	L	E	W	V	A	R	I	T	P	S	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A				
YW0.49	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	D	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A				
YW0.49.B7	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	D	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A				
YW0.49.C9	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	D	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A				
YW0.49.H2	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	D	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A				
YW0.49.H6	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	D	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A				
Kabat No.	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
YW0.32	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	C	I	L	C	F	G	P	L	W	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
YW0.49	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	K	L	W	V	S	R	A	G	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
YW0.49.B7	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	K	L	W	V	S	A	A	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		
YW0.49.C9	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	K	L	W	V	S	A	A	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		
YW0.49.H2	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	K	L	W	V	S	A	A	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		
YW0.49.H6	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	K	L	W	V	S	A	A	-	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		

Figura 12

Alineación de regiones variables de cadena ligera

Kabat No.	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						
YW0.32	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW0.49	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW0.49.B7	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW0.49.C9	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW0.49.H2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
YW0.49.H6	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q						
Kabat No.	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
YW0.32	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW0.49	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW0.49.B7	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW0.49.C9	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW0.49.H2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
YW0.49.H6	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Kabat No.	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108															
YW0.32	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	26						
YW0.49	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	26						
YW0.49.B7	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	27						
YW0.49.C9	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	28						
YW0.49.H2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	29						
YW0.49.H6	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	S	E	I	D	N	O	:	30						

Figura 13

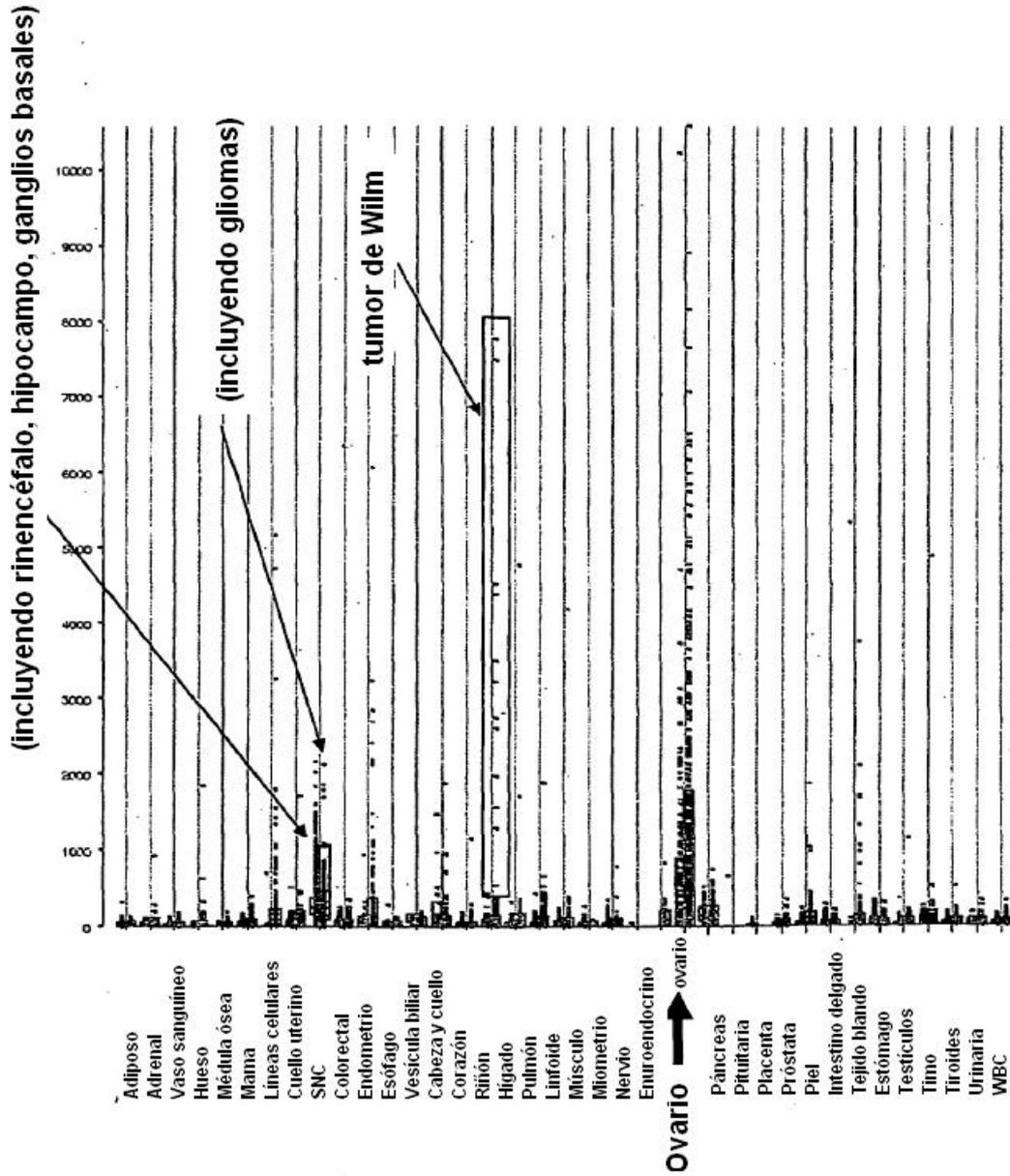


Figura 14

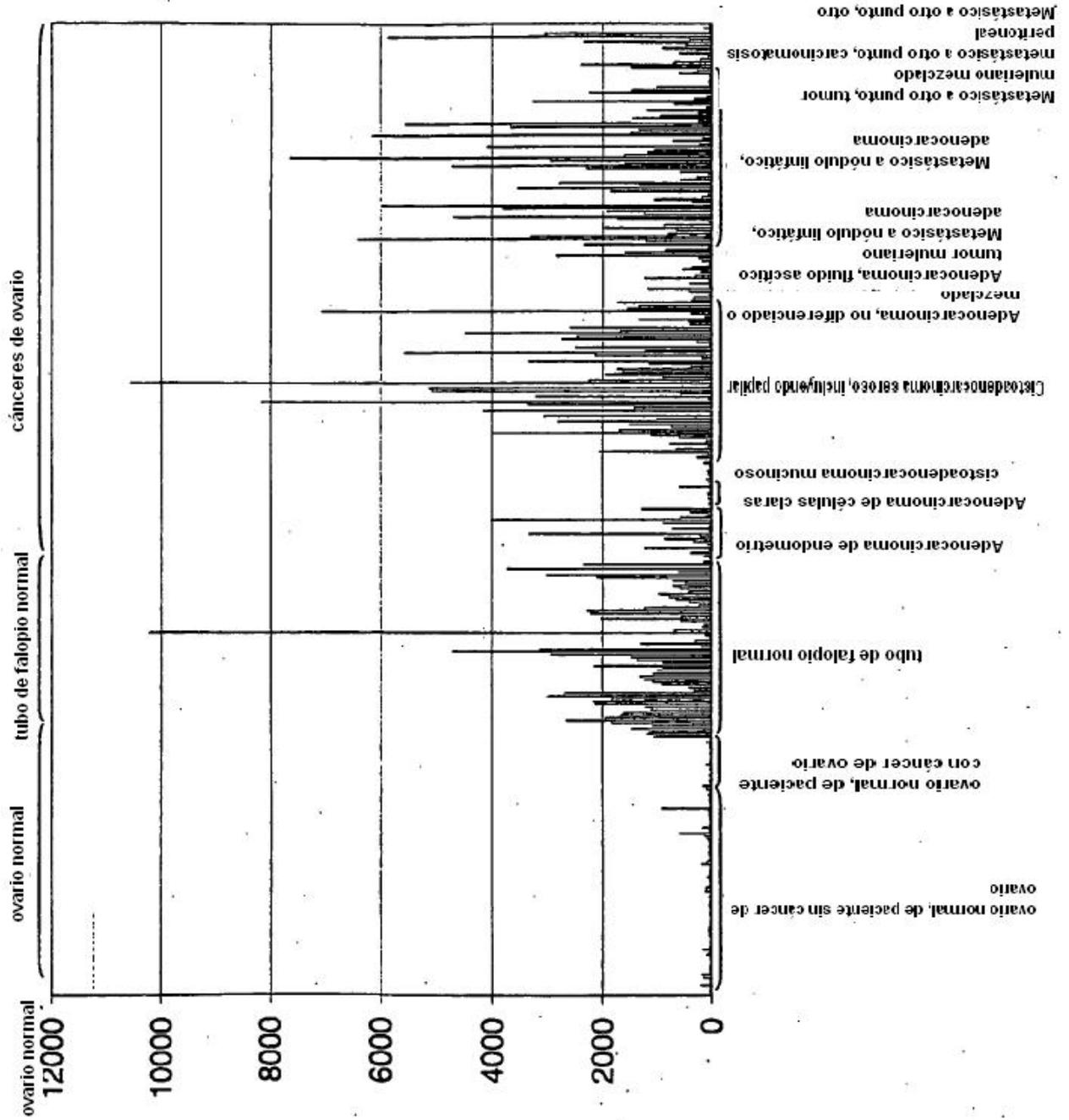
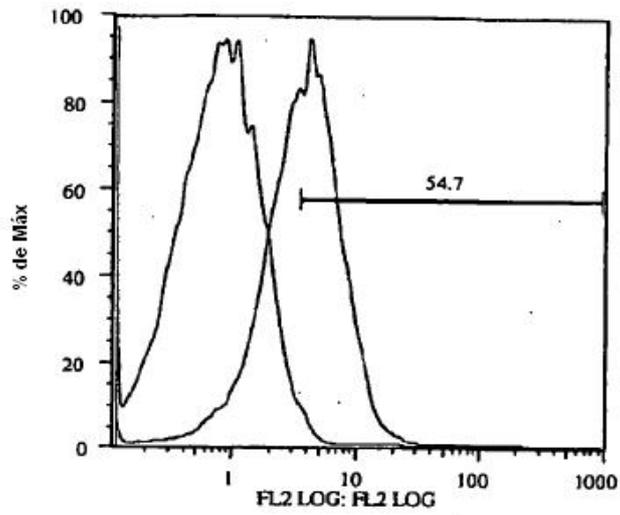
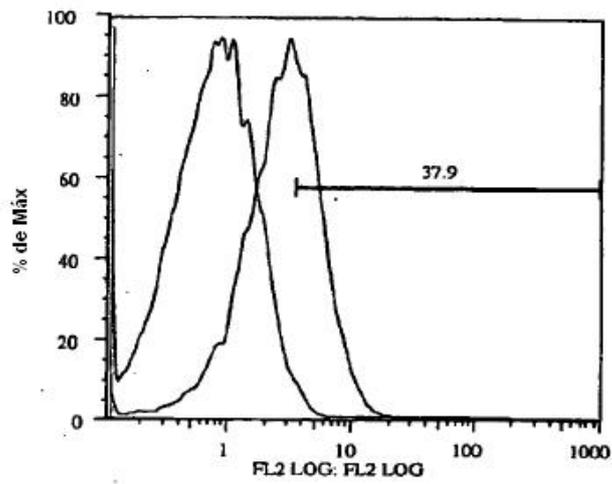


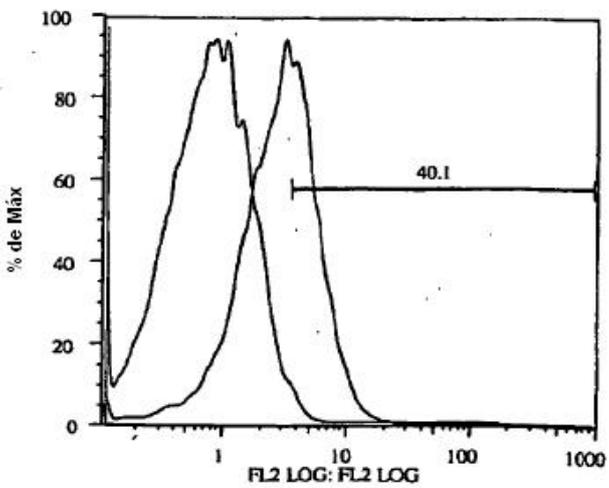
Figura 15



**YWO.49**



**YWO.49.H2**



**YWO.49.H6**

Figura 16

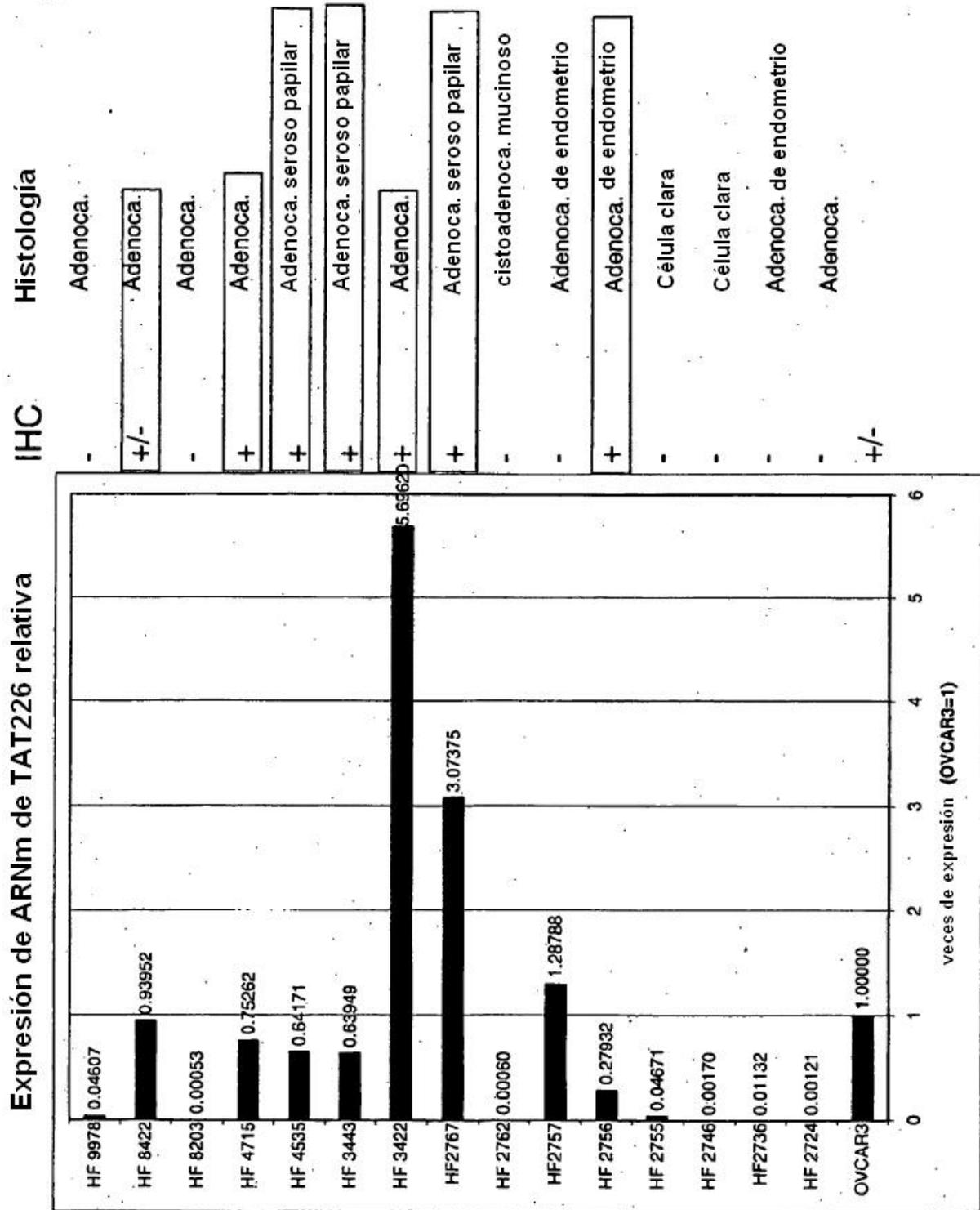


Figura 17

Ensayo de citólisis de OVCAR3

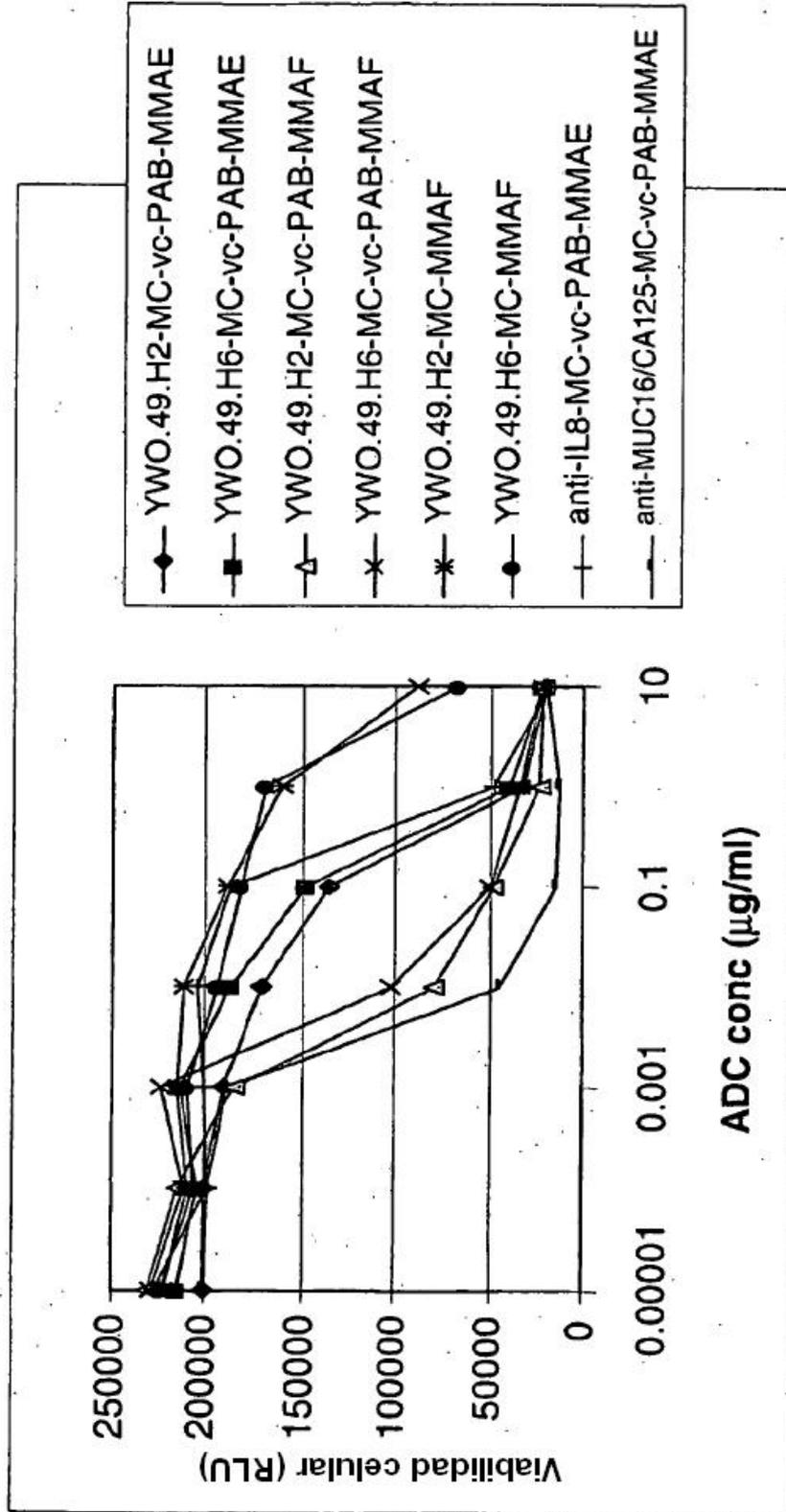


Figura 18

### Ensayo de citólisis HCT 116#9-4

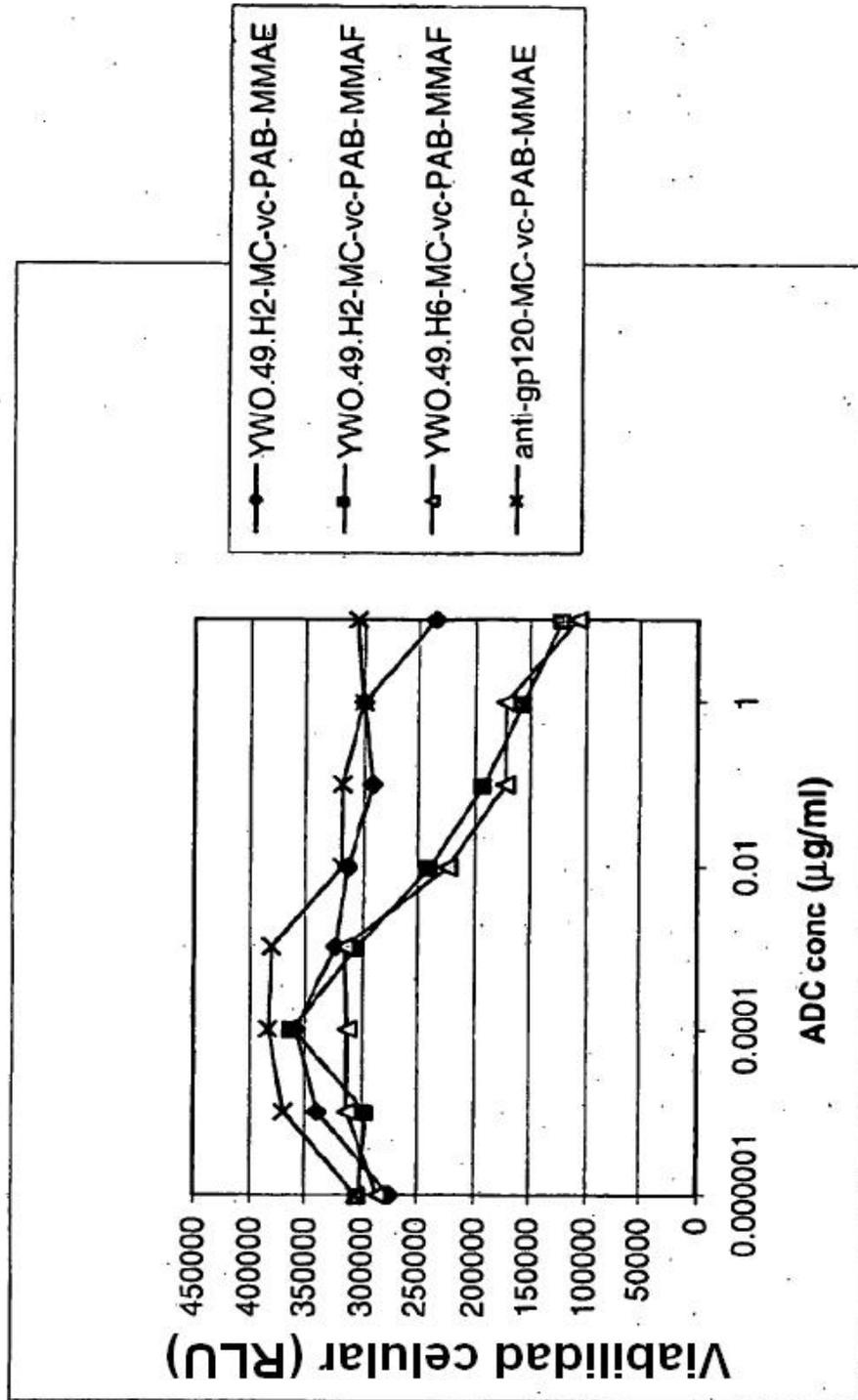


Figura 19

Eficacia de ADC contra xenoinjertos de células HCT116#9-4 en ratones atímicos desnudos

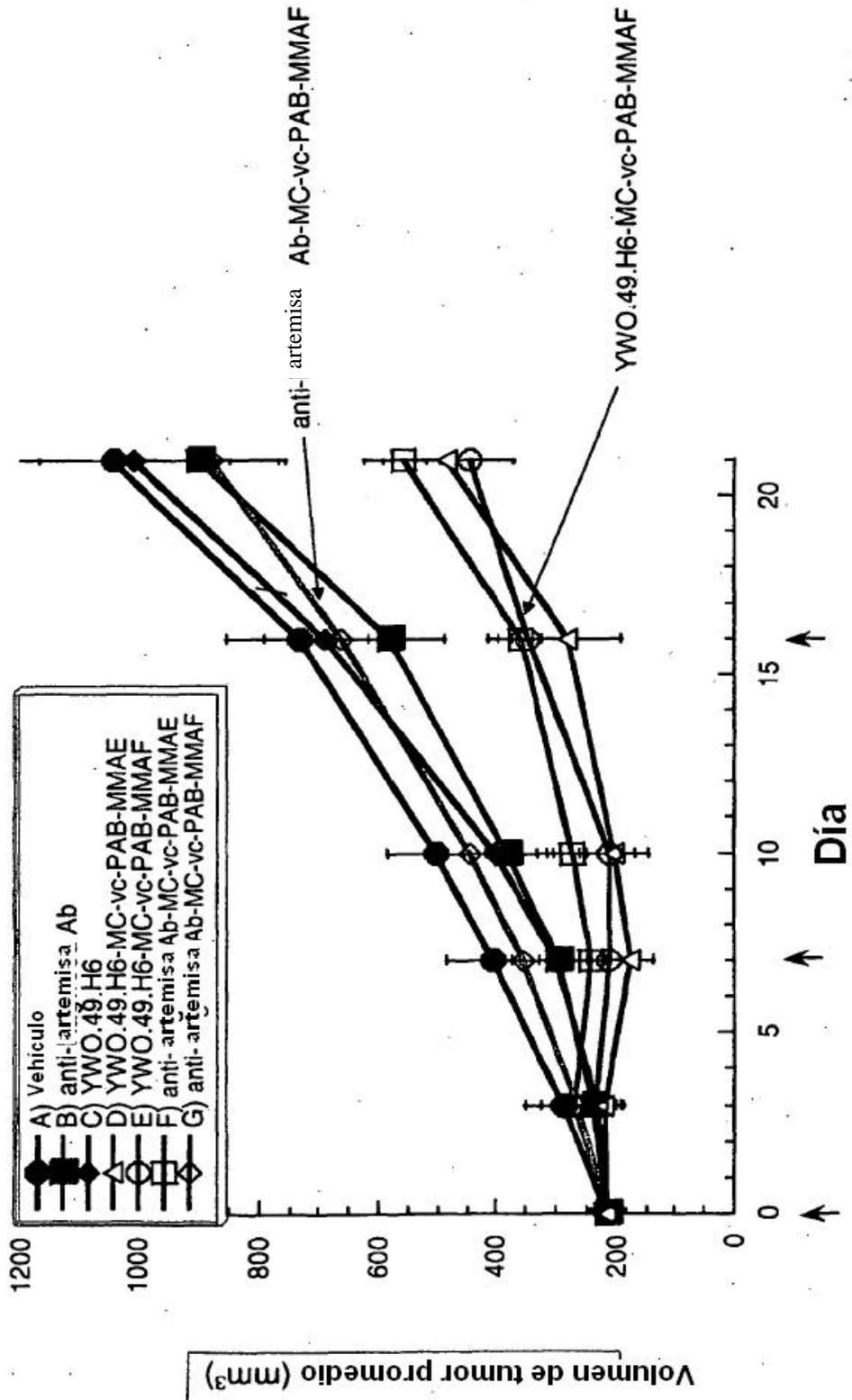


Figura 20

