

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 799**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2008 E 08784834 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 P 2167128**

54 Título: **Anticuerpos híbridos anti- integrina alfa V modificados genéticamente**

30 Prioridad:

17.07.2007 EP 07013964

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

15.02.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**GOODMAN, SIMON;
HAHN, DIANE;
MITJANS, FRANCESC;
ADAN, JAUME y
LO, KIN-MING**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 395 799 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 híbridos anti- integrina alfa V modificados genéticamente

Área de la invención

5 La presente invención hace referencia a anticuerpos modificados genéticamente que se unen de manera específica a receptores de integrina, especialmente a la subunidad del receptor de integrina alfa V. Los anticuerpos comprenden los sitios de unión al antígeno (CDRs, del inglés regiones determinantes de complementariedad), de un anticuerpo anti- integrina de ratón conocido, además de secuencias variables de la cadena liviana híbridas, secuencias variables de la cadena pesada mutadas (Frs) y secuencias constantes de la cadena pesada modificadas. Los anticuerpos novedosos han mejorado las propiedades inmunogénicas y de expresión, y suscitan
10 una actividad excelente anti-angiogénica además de anti-tumoral en humanos en monoterapia pero también, y sobre todo, en combinación con otros agentes inhibidores de la angiogénesis y de tumores, tales como cilengitide, cetuximab y agentes quimioterápicos.

Antecedentes de la invención

15 El tratamiento del cáncer sigue siendo un problema muy importante en la atención sanitaria. Una estrategia propuesta para el tratamiento del cáncer es la inhibición de la angiogénesis y, de ese modo, la inhibición de la generación y el desarrollo de vasos sanguíneos, los cuales proporcionan al tumor los medios de crecimiento pertinentes. Una segunda estrategia es dirigir la inhibición de receptores específicos en las superficies de células tumorales, tales como la inhibición de Her2 mediante Herceptin® o la inhibición de EGFR mediante cetuximab (Erbix®).

20 Se considera que los inhibidores de las integrinas son agentes anti-tumorales potencialmente útiles, ya que las integrinas se expresan en la neovasculatura y actúan de mediadores en la angiogénesis. Además, las integrinas se expresan en ciertas células tumorales y pueden promover de manera directa el crecimiento y la supervivencia tumoral.

25 Las integrinas no tienen ninguna actividad enzimática, pero las integrinas con la habilidad de enlazar sus ligandos (integrinas competentes para unir ligandos) se activan mediante la unión a proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Las integrinas, por un lado, desencadenan cascadas de quinasas intracelulares para modular el crecimiento y la supervivencia celular, y por otro lado se asocian con el citoesqueleto para impulsar el acoplamiento y la locomoción celular. La integrina $\alpha\beta 5$ enlaza de manera específica la vitronectina, mientras que el $\alpha\beta 3$ también enlaza otras macromoléculas de la ECM provisional. La $\alpha\beta 3$ se observó por primera vez en el cáncer como un marcador dependiente de la progresión en el melanoma maligno. Aumentaba el crecimiento del melanoma in vivo y la supervivencia in vitro. Los bloqueantes de $\alpha\beta 3$ invirtieron estos efectos. Posteriormente, la $\alpha\beta 3$ se observó en otros tumores incluyendo el glioblastoma, carcinomas renales, carcinomas ováricos y otros. La $\alpha\beta 3$ se sobre-expresó ampliamente en las EC en muchos casos de malignidad. In vitro, los modelos angiogénicos activados mediante los factores de crecimiento derivados del tumor se sobre-expresaron y necesitaron la $\alpha\beta 3$ en la
35 vasculatura que iba surgiendo, mientras que el bloqueo de la $\alpha\beta 3$ y la $\alpha\beta 5$ pudo suprimir el fenotipo angiogénico. También se mostró que la $\alpha\beta 5$ soporta la neo-vasculatura inducida por algunos factores de crecimiento derivados de tumores. La inhibición de la $\alpha\beta 5$ puede desencadenar la apoptosis de células tumorales.

40 Los receptores de integrina se encuentran sobre-expresados en los vasos sanguíneos invasivos del tumor, en los melanomas y algunos otros casos de malignidad, y modulan la respuesta celular a los factores de crecimiento. El compartimento vascular es una diana terapéutica prometedora ya que los tumores sólidos dependen de los vasos sanguíneos para el oxígeno, la nutrición, detoxificación y dispersión de las metástasis hematógenas; el cambio hacia el fenotipo angiogénico marca un paso discreto en la inducción de la malignidad, lo que resulta susceptible de intervención terapéutica; y la vasculatura experimenta cambio continuo, aunque las células endoteliales tienen una estabilidad genómica en relación al tumor, y son menos susceptibles de volverse resistentes a los fármacos a través
45 de la mutación.

Un primer fármaco anti- integrina es el cilengitide y se considera que es un agente anti-tumoral de gran utilidad (Eskens FA, et al. (2003) Eur J Cancer 39:917-26). Sin embargo, el cilengitide es una molécula pequeña que debe ser administrada con frecuencia. La estructura del cilengitide, forma de sal seleccionada por ejemplo, se encuentran reveladas en EP0770622, WO 0015244 y PCT/us07/01446 y se revelan en la presente patente a modo de
50 referencia.

Un segundo fármaco anti-integrina es el mAb 17E6 (EMD 73034) de ratón, que inhibe de manera específica la subunidad de integrina αv del receptor de integrina humana que porta células. El anticuerpo de IgG1 de ratón se describe, por ejemplo, por Mitjans et al. (1995; J.Cell Sci. 108, 2825) y en las patentes US 5,985,278 and EP 719 859. Las secuencias variables de la cadena pesada y liviana se representan en SEQ ID Nos. 25 y 26 (Figuras 20A,

B). Se generó 17E6 murino a partir de ratones inmunizados con $\alpha v\beta 3$ humana inmovilizada con Sefarosa y purificada. Se fusionaron linfocitos del bazo de ratones inmunizados con células de mieloma, y uno de los clones de hibridomas resultantes produjo el anticuerpo monoclonal 17E6 (EMD 73034). El mAb 17E6 de ratón es producido por la línea celular hibridoma 272-17E6 y se deposita bajo el número de accesoión DSM ACC2160.

5 El 17E6 de ratón antagoniza la interacción de la integrina con la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), y altera la función de las células endoteliales y tumorales. Los efectos principales del anticuerpo incluyen alterar la adhesión y desplazamiento de las células endoteliales (EC, por sus siglas en inglés), induciendo su apoptosis, y suprimiendo la activación de las vías de los factores de crecimiento. El bloqueo mediante dicho anticuerpo suprime, de forma directa, la supervivencia tanto de las células endoteliales activadas como de algunas células tumorales.

10 Los anticuerpos monoclonales tales como el 17E6 son, en general, de utilidad para la inhibición de las interacciones extracelulares proteína-proteína, tal como la inhibición de las interacciones receptor-ligando. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales son, a menudo, difíciles de expresar y con frecuencia provocan una respuesta inmune, tal como una respuesta anti-idiotípica, lo que limita su eficacia.

15 Estos datos y conocimiento principal recopilados hasta el momento, han apoyado la necesidad del desarrollo de un anticuerpo 17E6 de ratón modificado con propiedades mejoradas que se una, de manera específica, a integrinas, que pueda ser expresado de manera eficiente, y que sea relativamente no inmunogénico en humanos como agente terapéutico en el cáncer. Un anticuerpo de tales características modificado genéticamente debería tener el potencial de suprimir el desarrollo del tumor tanto de forma indirecta, a través de la vasculatura del tumor, como de forma directa en las propias células tumorales.

20 Resumen de la invención

La presente invención hace referencia a nuevos anticuerpos que presentan las características biológicas del anticuerpo 17E6 (EMD 73034) de ratón, pero con propiedades mejoradas sobre todo con respecto a la inmunogenicidad en humanos y a la expresión satisfactoria en los sistemas de expresión de mamíferos, a una escala de producción industrial y de fabricación.

25 La invención proporciona algunos anticuerpos modificados genéticamente que tienen secuencias modificadas, que reconocen el mismo epítipo receptor que el anticuerpo de ratón 17E6 pero muestran inmunogenicidad reducida en humanos y pueden ser expresados en mejor manera en comparación al anticuerpo no modificado.

30 Debe señalarse que modificar o modificar por ingeniería genética un anticuerpo derivado de ratón, a fin de obtener inmunogenicidad reducida en humanos, va, por regla general, acompañado por una pérdida significativa de expresión y/o de afinidad de unión. Así, la quimerización o humanización de acuerdo a técnicas estándar bien conocidas conduce de manera habitual a una disminución de la expresión, afinidad de unión, etc., lo que puede ser resuelto, únicamente de forma parcial, mediante retromutación específica u otras medidas. No pueden predecirse modificaciones dentro de una molécula de proteína respectiva que sean exitosas de manera simultánea con respecto a la inmunogenicidad reducida, expresión elevada y afinidad de unión satisfactoria. De este modo, disminuir la cantidad de epítopos de linfocitos T, a fin de eliminar o reducir una respuesta inmune contra el fármaco, en un humano como principal problema a ser resuelto, puede conducir a una pérdida no tolerable de expresión o de afinidad de unión, o ambas cosas, que conduciría a problemas adicionales a resolver.

35 Es, por lo tanto, objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos modificados genéticamente con una especificidad diana definida que provoca inmunogenicidad reducida, expresión satisfactoria y una buena afinidad de unión. Estas propiedades pueden ser obtenidas mediante modificaciones sorprendentes dentro de la molécula fuente original de ratón mAb 17E6. En muchos de los experimentos tiene sentido comparar los resultados no directamente con el anticuerpo 17E6 de ratón sino con una versión quimérica (que contiene regiones constables humanas). Los anticuerpos quiméricos exitosos del arte, por regla general, muestran suficiente afinidad de unión y suficiente expresión, pero provocan a menudo una respuesta inmune en un individuo humano.

40 En principio, la presente invención proporciona anticuerpos híbridos anti- integrina αv recombinantes, modificados genéticamente con inmunogenicidad reducida o eliminada en humanos que comprenden

(i) una región de la cadena pesada y de la liviana CDR que se deriva a partir de un anticuerpo 17E6 monoclonal anti- integrina αv de ratón

45 (ii) una región armazón de la cadena liviana que se toma de un anticuerpo 425 anti- EGFR monoclonal humanizado,

(iii) una región armazón de la cadena pesada que se deriva a partir de un anticuerpo monoclonal anti- integrina αv 17E6, y

(iv) una región constante de la cadena pesada que se deriva de la IgG humana y de una región constante de la cadena liviana humana.

5 El anticuerpo monoclonal 425 (matuzumab) humanizado es conocido, por ejemplo de la patente EP 531 472, y se deriva de su equivalente 425 murino (MAb 425, ATCC HB9629 de ratón). El anticuerpo se produjo contra la línea celular del carcinoma A431 humano, y se observó que se une a un epítipo polipeptídico en el dominio externo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés). Se observó que inhibía la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en ambos sitios, los sitios de baja y los de alta afinidad del EGFR. El matuzumab ha mostrado alta eficacia en ensayos clínicos. Las secuencias de FR de la cadena liviana del matuzumab se encuentran representadas en SEQ ID Nos. 12 – 15, tal como se especifica más adelante y en las reivindicaciones.

15 Combinar las regiones armazón (FRs, por sus siglas en inglés) de la cadena pesada modificada del anticuerpo 17E6 de ratón anti- integrina, con regiones armazón de la cadena liviana de un anticuerpo humanizado anti-EGFR h425 específico de modo diferente (matuzumab), ha generado – aparte de otra modificación – algunos anticuerpos con propiedades inmunogénicas superiores, que son expresadas además suficientemente en sistemas de expresión mamíferos estándar. Al utilizar la región VL (FRs) de mAb h425 sorprendentemente el nivel de expresión es aumentado de manera significativa, pero, como se mostró más adelante, tuvieron que realizarse mutaciones adicionales a fin de mejorar otras propiedades, sobre todo, afinidad de unión.

20 Una modificación adicional importante es la sustitución de un residuo aminoácido dentro de la región CDR2 de la cadena pesada del 17E6 de ratón. Mediante la sustitución de un residuo de cisteína por un residuo de tirosina, de forma sorprendente, la estabilidad de la proteína y el nivel de expresión pueden mejorarse de manera significativa, al menos en comparación con una versión del 17E6 quimérico.

25 Pueden obtenerse mejoras adicionales en la expresión y estabilidad mediante la sustitución de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 de ratón por una IgG2 humana con una región bisagra de la IgG1 humana. En un modo de realización preferente, dicha IgG2 puede ser modificada de forma adicional mediante la sustitución de un residuo de arginina en la posición 297 por uno de glutamina (N297Q). Esta modificación elimina un sitio de N-glicosilación y, de este modo, suprime o reduce la actividad ADCC y CDC de los anticuerpos a ser modificados genéticamente. Desafortunadamente, mediante esta medida, la inmunogenicidad aumenta, aparentemente por la generación de un nuevo epítipo de linfocito T. De forma sorprendente, sustituyendo una fenilalanina por una alanina en la posición 296, puede restituirse una menor inmunogenicidad.

30 A fin de reducir la cantidad de epítipos de linfocitos T en la región armazón de la cadena pesada original del mAb17E6 de ratón, numerosas mutaciones han sido realizadas. En detalle, mutaciones en una, más o todas de las siguientes posiciones del anticuerpo de ratón: A9, E13, M20, K38, R40, A72, S76, Q82, G85, T87, S91 y S113, son necesarias para reducir la inmunogenicidad.

35 Un anticuerpo modificado genéticamente preferente de acuerdo a la invención, que muestra los mejores valores de las propiedades mejoradas es designado en lo sucesivo como "DI-17E6" o de forma sinónima "DI-17E6γ2h(N297Q)" o "EMD 525797", y tiene la siguiente secuencia:

(i) las secuencias variables y constantes de la cadena liviana (SEQ ID No. 3, Figura 1 C):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSKIH
GVPSRFGSGSGTDYFTFTISSLQPEDIATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSLTSLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Y

40 (ii) secuencias variables y constantes de la cadena pesada (SEQ ID No. 4, Figura 1 D):

QVQLQDSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSS**FWMHWVRQAPGQGLEWIGYINP**
RSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS**FLGRGAMDY**
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVSFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK,

en donde las secuencias subrayadas representan las regiones variables con las CDR (en negrita). La región constante de la cadena liviana es kappa humana. La región constante de la cadena pesada en la IgG2 humana con la región bisagra de la IgG1 modificada **EPKSSDKTHTCPPCP** (SEQ ID No. 40).

5 Las secuencias de ADN correspondientes de DI-17E6 se muestran en las Figuras 17-19.

La invención está también dirigida a los anticuerpos modificados genéticamente, tal como se describen anteriormente y a continuación, que se fusionan directamente, o a través de una molécula conectora, a las citocinas, tales como IL-2, IL-12, TNF α , IFN α , IFN β , o factores de crecimiento. Las citocinas de fusión de anticuerpos pueden también ser utilizadas en la terapia tumoral y/o enfermedades relacionadas con la angiogénesis, ya que la porción de citocina puede contribuir a una citotoxicidad aumentada. Las proteínas de fusión de anticuerpos, en especial las inmunocitocinas son bien conocidas en el arte. Una proteína de fusión preferente de acuerdo a la presente invención es DI-17E6-IL2, o DI-17E6-(L)-IL2, en donde L es un péptido conector.

De acuerdo a la presente invención, se ha mostrado que los anticuerpos modificados genéticamente tal como se ha descrito, pueden ser utilizados en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la angiogénesis y/o enfermedades relacionadas con tumores. De forma sorprendente, los anticuerpos de acuerdo a la invención provocan un efecto directo en el crecimiento tumoral, que parece ser independiente sobre el efecto anti-tumoral indirecto causado por el bloqueo a la angiogénesis.

Es además objeto de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas y su uso comprendiendo un segundo agente terapéutico, que es de manera preferente un agente quimioterápico, tal como cisplatino, doxorubicina, etc., un inhibidor de la integrina αv , tal como péptidos RGD, por ejemplo, cilegitide, o inhibidores de la tirosina quinasa, en especial anticuerpos anti-erbB1 o erbB2. Ejemplos preferentes son aquí el cetuximab (anticuerpo monoclonal c225, Erbitux®), matuzumab (anticuerpo monoclonal 425 humanizado), o Herceptin® (anticuerpo humanizado 4D5).

De acuerdo a la invención, los anticuerpos modificados genéticamente en dichas composiciones farmacéuticas, tal como se revela en la presente patente, pueden reforzar el efecto del segundo agente terapéutico, en muchos casos mediante interacción sinérgica.

De acuerdo a la invención, la combinación del anticuerpo modificado genéticamente preferente DI-17E6, o variantes similares, con anticuerpos anti-EGFR, de manera preferente cetuximab, causa un efecto sorprendente, concretamente el retraso o la prevención de la regeneración del tejido tumoral después de detener la administración con el anticuerpo modificado genéticamente, de manera preferente DI-17E6.

La composición farmacéutica que comprende un segundo agente terapéutico puede además ser utilizado como un kit de piezas que comprende en un primer envase el anticuerpo modificado genéticamente, preferentemente DI-17E6, y en un segundo envase un segundo agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor de la angiogénesis, un agente quimioterápico o un inhibidor de la tirosina quinasa, tal como un anticuerpo anti-EGFR o anti-Her2.

35 En resumen, la invención hace referencia a lo siguiente:

- Un anticuerpo híbrido anti- integrina αv recombinante modificado genéticamente, que comprende:

(i) una región de la cadena pesada y de la liviana CDR que se deriva a partir de un anticuerpo 17E6 monoclonal anti- integrina α v de ratón

(ii) una región armazón de la cadena liviana que se toma de un anticuerpo 425 anti- EGFR monoclonal humanizado,

5 (iii) una región armazón de la cadena pesada que se deriva a partir de un anticuerpo monoclonal anti- integrina α v 17E6, y

(iv) una región constante de la cadena pesada que se deriva de la IgG humana y de una región constante de la cadena liviana humana.

10 en donde las regiones CDR de la cadena liviana, que se derivan del anticuerpo 17E6 monoclonal anti-integrina α v de ratón son:

CDR1: RASQDISNYLA (SEQ ID No. 5)

CDR2: YTSKIHS (SEQ ID No. 6);

CDR3: QQGNTFPYT (SEQ ID No. 7),

Y las regiones CDR de la cadena pesada son:

15 CDR1: SFWMH (SEQ ID No. 8),

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD (SEQ ID No. 9).

CDR3: FLGRGAMDY (SEQ ID No. 10),

y en donde la región armazón de la cadena liviana que se deriva a partir del anticuerpo 425 anti-EGFR monoclonal humanizado, comprende la secuencia

20 FR-1: DIQMTQS PSSLSASVGDRTITC (SEQ ID No. 12),

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID No. 13)

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDIATYYC (SEQ ID No. 14)

FR-4: FGQGTKVEIK (SEQ ID No. 15),

25 Y, en donde dicha región armazón de la cadena pesada (FR1 – FR4) que deriva del anticuerpo 17E6 de ratón es mutada en las posiciones de aminoácidos 1 – 15 para reducir o eliminar la cantidad de epítopos de linfocitos T y, de este modo, la inmunogenicidad en humanos.

Dicha región armazón de la cadena pesada es mutada en todas de las siguientes posiciones del anticuerpo de ratón: A9, E13, M20, K38, R40, A72, S76, Q82, G85, T87, S91 y S113, y comprende las siguientes mutaciones:

A9G, E13K, M20V, K38R, R40A, A72T, S76T, Q82E, G85S, T87R, S91T y S113T.

30 • Un anticuerpo híbrido anti- integrina α v recombinante modificado genéticamente que comprende

(i) las regiones CDR de la cadena liviana:

CDR1 : RASQDISNYLA (SEQ ID No. 5);

CDR2: YTSKIHS (SEQ ID No. 6);

CDR3: QQGNTFPYT (SEQ ID No. 7),

35 (ii) las regiones CDR de la cadena pesada:

CDR1: SFWMH (SEQ ID No. 8),

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD (SEQ ID No. 9), y

CDR3: FLGRGAMDY (SEQ ID No. 10);

(iii) las regiones armazón de la cadena liviana:

FR-1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC (SEQ ID No. 12),

5 FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID No. 13)

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDIATYYC (SEQ ID No. 14)

FR-4: FGQGTVKVEIK (SEQ ID No. 15)

(iv) las regiones armazón de la cadena pesada

FR1: QVQLQQSG**A**EL**A**EPGASV**K**M**S**CKASGYTFS (SEQ ID No. 16)

10 FR2: W**V****K****R**PGQGLEWIG (SEQ ID No. 17)

FR3: KATMT**A**DT**S**SSTAYM**Q**L**S****G**L**T**SE**D****S**AVYYCAS (SEQ ID No. 18)

FR4: WGQGT**S**TVVSS (SEQ ID No. 19),

15 en donde todas las posiciones en negrita y subrayadas son mutadas tal como se ha descrito anteriormente y como se describe más adelante, a fin de reducir o eliminar los epítomos de linfocitos T y de este modo la inmunogenicidad en un humano, y

(v) una región constante de la cadena pesada que se deriva de la IgG humana y una región de la cadena liviana constante humana.

• Un anticuerpo modificado genéticamente tal como se ha descrito, en donde dichas regiones armazón de la cadena pesada son:

20 FR1: QVQLQQSGGELAKPGASVKV**S**CKASGYTFS (SEQ ID No. 20)

FR2: WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID No. 21)

FR3: KATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS (SEQ ID No. 22)

FR4: WGQGT**T**TVVSS (SEQ ID No. 23).

25 • Un anticuerpo tal como se ha descrito, en donde la región constante de la cadena pesada se deriva de la IgG2, en donde en un modo de realización preferente dicha región constante de la IgG2 comprende una región bisagra de la IgG1 modificada.

• Un anticuerpo modificado genéticamente tal como se ha descrito, en donde dicha región bisagra de la IgG1 modificada comprende la secuencia EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID No. 24).

30 • Un anticuerpo modificado genéticamente tal como se ha descrito, en donde dicha región constante de la IgG2 se modifica sustituyendo el aminoácido N por Q en la posición 297 (N297Q).

• Un anticuerpo modificado genéticamente tal como se ha descrito, en donde el residuo aminoácido F en la posición 296 es sustituido por A (F296A) a fin de eliminar un epítomo de linfocito T generado por la modificación en la posición 297.

35 • Un anticuerpo modificado genéticamente tal como se ha descrito, en donde la región constante de la cadena liviana es kappa humana.

• Un anticuerpo híbrido anti- integrina α v recombinante designada como "DI-17E6" que consiste, de manera esencial, en

(i) secuencias variables y constantes de la cadena liviana (SEQ ID No. 3):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDI SNYLAWYQOKPGKAPKLLIYYTSKIH
GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDYATYYCQOQNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

y

(ii) secuencias variables y constantes de la cadena pesada (SEQ ID No. 4):

QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHWRQAPGQGLEWIGYINP
RSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFLGRGAMDY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKV
 NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK,

5

en donde las formaciones de secuencia subrayadas representan las regiones variables, incluyendo las CDR (en negrita). Las secuencias en negrita en las regiones constantes representan la región bisagra modificada (**EPKSSDKTHTCPPCP**) y las mutaciones en las posiciones 296 y 297.

10

- Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo tal como se ha descrito, que se fusiona de manera preferente a través de su C-terminal a una citocina o un factor de crecimiento, de manera preferente a una citocina.

- Una molécula de ADN que codifica un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo tal como se ha descrito.

- Un vector de expresión que comprende dicha molécula de ADN.

15

- Un plásmido de expresión que comprende los segmentos de ADN tal como se ha especificado en la Figura 15, y designado como pdHL10-DI-17E6g2h(N297Q).

- Un sistema de expresión de proteínas que comprende una célula hospedadora mamífera transformada con dicho plásmido de expresión, en donde una célula hospedadora humana es excluida.

20

- Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo tal como se ha especificado anteriormente y como se especifica más adelante en una cantidad farmacéuticamente efectiva, de manera opcional junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25

- Una composición farmacéutica que comprende un primer y un segundo agente terapéutico farmacéuticamente efectivo, en donde el primer agente es un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo tal como se ha especificado, y el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en: un

agente quimioterápico, un inhibidor de la angiogénesis y un agente antitumoral, de manera opcional en conjunto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

• Una composición farmacéutica correspondiente, en donde el agente anti-tumoral es un anticuerpo anti-tumoral, en especial un anticuerpo anti-EGFR (erbB1) o un anti-Her2 (erbB2), tal como mAb c225 (cetuximab, Erbitux®) y mAb h425 (matuzumab).

• Una composición farmacéutica correspondiente, en donde el inhibidor de la angiogénesis es el inhibidor de la integrina cilengtide. Erbitux® y mAb h425 (matuzumab).

• El uso de un anticuerpo modificado genéticamente o una proteína de fusión de anticuerpo tal como se ha especificado para la producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis y/o tumores sólidos o metástasis tumoral.

• El uso de una composición farmacéutica tal como se ha especificado para la producción de un medicamento para el tratamiento de tumores, en donde dicho anticuerpo modificado genéticamente aumenta la eficacia del segundo agente.

• El uso de una composición farmacéutica tal como se ha especificado para la producción de un medicamento para el tratamiento de tumores, en donde el segundo agente es un anticuerpo anti-EGFR, y dicho anticuerpo modificado genéticamente evita o retrasa la regeneración tumoral después de detener la administración del anticuerpo modificado genéticamente.

Descripción detallada de la invención

A fin de reducir el potencial para la inmunogenicidad en humanos, se realizó DI-17E6 (EMD 525797) por desinmunización y por modificación mediante ingeniería genética del 17E6 (EMD 73034) murino.

La desinmunización de un anticuerpo de acuerdo a la invención significa la detección y eliminación de epítomos de linfocitos T humanos del anticuerpo de ratón original. Esta tecnología es diferente a la aproximación de la "humanización" que sustituye secuencias de ratón con secuencias de consenso humanas. La tecnología de desinmunización utilizada, se describe, por ejemplo, en WO 98/52976, WO 00/34317 y WO 02/69232.

Las regiones variables de las cadenas liviana (VL) y pesada (VH) del 17E6 murino se analizan in silico para eliminar los epítomos de células de linfocitos T colaboradores. Las secuencias desinmunizadas de VH y de VL están designadas para retener aquellos aminoácidos de la secuencia murina crítica para la unión, tales como las CDRs.

Para optimizar la expresión, las regiones armazón de la cadena liviana fueron sustituidas por las de un anticuerpo 425 humanizado. Más aún, la cisteína-60 en la VH no emparejada, que era poco frecuente entre las secuencias VH, se convirtió en tirosina (C60Y) para mejorar la estabilidad de la proteína.

Una de las características de EMD 525797 es no desencadenar las respuestas inmunes. Para lograr esto, las regiones constantes de la inmunoglobulina se modificaron tal como sigue a continuación. Para la cadena liviana, se utilizó la región constante kappa humana. Para la cadena pesada, se utilizaron las regiones constantes de la genómica humana gamma-2 (72), pero la región bisagra con los cuatro enlaces disulfuro de cisteína se sustituyó por una región bisagra modificada y1 para minimizar la aleatorización del enlace disulfuro y para mejorar la expresión. Una mutación de Asn-297 en el dominio CH2 a Gln (N297Q), fue introducida para eliminar la señal de N-glicosilación: la des-glicosilación resultante suprime las funciones efectoras y prolonga la vida media en suero del anticuerpo.

Finalmente, Phe-296 fue mutado a Ala, lo que eliminó los epítomos de linfocitos T potenciales creados por la mutación N297Q.

El anticuerpo DI-17E6 preferente obtenido mediante los métodos descritos brevemente con anterioridad (estructura esquemática está representada en la Figura 16) tiene las siguientes propiedades:

El DI-17E6 muestra la potencia y selectividad en el receptor aislado y el nivel celular (por ejemplo, unión del receptor, adhesión celular y estudios de migración celular).

El DI-17E6 muestra actividad inhibitoria del crecimiento tumoral in vitro y en modelos animales (por ejemplo, ratón desnudo con tumor experimental, quimera de piel de ratón SCID/humana).

El DI-17E6 muestra actividad anti-angiogénica en modelos animales (por ejemplo quimera de piel de ratón SCID/humana, ensayo con plug (soporte) de Matrigel en monos).

El DI-17E6 inhibe de manera selectiva la unión de proteínas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) a receptores de integrina αv y bloquea la adhesión celular, acoplamiento y migración mediada por integrina αv . Una vez que es inducido el desprendimiento celular, dos eventos adicionales tienen lugar: las vías de activación celular son bloqueadas, y la integrina αv se internaliza en un cultivo tisular. La unión del fibrinógeno al receptor plaquetario GPIIb/IIIa y la aglutinación de las plaquetas no se ven afectadas y el EMD no desencadena ni la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) ni la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés).

El DI-17E6 (EMD 525797) muestra una especificidad de especie limitada y únicamente se reconocen las integrinas αv humanas y de monos. Se inhibió el crecimiento de un melanoma pobre en integrina αv y una respuesta de crecimiento vascular mediante el EMD 525797 en piel humana injertada en ratones SCID. La administración sistémica de EMD 525797 en monos sanos bloqueó la angiogénesis provocada por implantación subcutánea de plugs que contienen factores de crecimiento angiogénico como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, por sus siglas en inglés). El EMD 525797 ha demostrado además una actividad anti-tumoral directa en modelos de xenoinjertos de integrina $\alpha v\beta 3$ que expresa tumores humanos, incluyendo algunos melanomas. En estudios de terapia de combinación la actividad de EMD 525797 establece una buena sinergia con fármacos quimioterápicos, permitiendo utilizar concentraciones menores y menos tóxicas de quimioterápicos estándar y aún así permanecer efectivos en un entorno de tipo clínico. Estos experimentos únicamente consiguieron demostrar la actividad anti-tumoral potencial de EMD 525797, ya que los endotelios vasculares murinos no expresan la integrina αv diana y no son, por lo tanto, reconocidos por el anticuerpo.

Los datos de un estudio de toxicología de 4 semanas no reveló ningún efecto relacionado con el tratamiento, del DI-17E6 en observaciones clínicas, peso corporal y consumo de alimentos, ECG, temperatura corporal, tasa respiratoria, patología clínica (hematología, química sérica), urianálisis, peso de los órganos, propiedades macroscópicas e histopatología.

En base a estos datos, se consideró que las dosis de 10, 33 y 100 mg de EMD 525797 por kg de peso corporal por día, administrados una vez por semana durante cuatro semanas por infusión intravenosa (1h), eran bien toleradas y se encontraban bajo las condiciones de estudio. El anticuerpo no es activo por vía oral, pero ha sido administrado de manera exitosa por vía de infusión intravenosa, y por vía intraperitoneal en estudios de animales, en los que se ha mostrado que inhibe la angiogénesis y el crecimiento de varios tumores experimentales diferentes.

Un ensayo de cribado bacteriano que investigaba el potencial mutagénico del EMD 525797, mostró que el EMD 525797 no es mutagénico. No se observaron alertas farmacológicas de seguridad del EMD 525797 en estudios de toxicidad por dosis repetidas en mono cynomolgus.

El EMD 525797 tiene un peso molecular teórico de 145,208Da, que ha sido verificado de forma experimental a través de análisis de espectrografía de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF-MS, por sus siglas en inglés) y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem LC-ESI-Q-TOF MS (por sus siglas en inglés). El punto isoeléctrico se encuentra en un rango de 7.35 a 8.15 con una media de 7.75. El coeficiente de extinción es 1.42.

El EMD 525797 inhibe la adhesión de células endoteliales humanas a la vitronectina con un EC50 de aproximadamente 10 nM. El EMD 525797 bloquea las adhesiones de células tumorales mediadas por las integrinas αv con un EC50 que se encuentra en un rango de 0.1 a 50 nM. La migración de células endoteliales humanas inducida por VEGF en la vitronectina se bloquea también mediante el EMD 525797 con un EC50 de aproximadamente 50 nM. De forma similar, la proliferación y la supervivencia de las células endoteliales humanas colocadas en placas sobre ligandos de integrina αv se bloquean también mediante el EMD 525797.

El EMD 525797 se dirige a las integrinas αv endoteliales y interrumpe la formación de vasos. Inhibe, en especial, las integrinas $\alpha v 5$ y bloquea el comportamiento celular mediado por integrina αv , incluyendo el acoplamiento, y la migración. Las vías de señalización de la integrina alfa-v y el factor de crecimiento interactúan, de manera que la unión del EMD 525797 puede también alterar la diferenciación, proliferación y la supervivencia. Además de su efecto anti-angiogénico, el EMD 525797 promueve, de manera evidente, la apoptosis como un efecto anti-tumoral directo en células malignas de presentación a la diana. El EMD 525797 puede bloquear el acoplamiento celular, induce el desprendimiento celular, bloquea la migración, proliferación y supervivencia en los ligandos de integrina αv .

La DI-17E6 es la primera proteína desinmunizada para la cual los datos de inmunogenicidad en humanos se encuentran disponibles: En un ensayo clínico respectivo anti- DI-17E6 no se detectaron anticuerpos en dosis por encima de 500 mg, que es una dosis común terapéuticamente efectiva para anticuerpos. En comparación, anticuerpos anti fármaco pudieron detectarse en ensayos en animales en dosis calculadas de manera proporcional.

5 En general, el comportamiento inmunológico de DI-17E6 se considera más compleja: la unión de 17E6 a αv promoverá la captación en las células dendríticas. La unión a FcR por parte de 17E6 parece estar eliminada. La unión de 17E6 al receptor de integrina inhibirá, probablemente, un mecanismo inmunosupresor natural. De este modo, los resultados obtenidos mediante los anticuerpos modificados genéticamente, de forma preferente, DI-17E6, no son esperados en ningún caso y resultan sorprendentes.

DI-17E6 presenta una afinidad de unión al receptor de integrina $\alpha v \beta$ que es similar a la de 17E6 quimérico que comprende las mismas regiones constantes que DI-17E6. De manera sorprendente, una mutación del anticuerpo que ya comprende las regiones armazón variables de mAb 425 humanizado, pero todavía la región VH original del anticuerpo 17E6 de ratón, no se une al receptor de integrina.

10 DI-17E6 se expresa bien mediante células NS0 y otras líneas celulares de mamíferos. De manera interesante, la mutación que no muestra ninguna afinidad de unión a la integrina tal como se ha descrito con anterioridad, muestra la misma tasa de expresión favorable. Estos y similares resultados muestran que la predicción de las tres propiedades deseadas: inmunogenicidad reducida, altos niveles de expresión y afinidad de unión satisfactoria, no es posible.

15 Los pasos de angiogénesis in vitro e in vivo son alterados por DI-17E6, como también lo es el crecimiento tumoral del melanoma. DI-17E6 puede aumentar la actividad de las terapias basadas en fármacos citotóxicos, conduciendo a una mayor actividad anti-tumoral in vivo.

20 La DI-17E6 causa la despolimerización de las adhesiones focales dependientes de $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$. Estos complejos de señalización se ensamblan después del ligamiento de la integrina. Organizan la comunicación con las vías de crecimiento, la supervivencia y la motilidad, su destrucción puede desencadenar la apoptosis.

De este modo, DI-17E6 utiliza una combinación de efectos mecanoquímicos y bioquímicos para influir en los endotelios y para aumentar el estrés en las células tumorales.

25 La DI-17E6 ejerce sus actividades biológicas in vivo a través de los efectos sobre al menos dos compartimentos celulares diferentes dentro del tumor: a las propias células tumorales, y a las células endoteliales tumorales activadas de forma angiogénica. El acoplamiento celular endotelial y tumoral mediado por $\alpha v \beta 3$ o $\alpha v \beta 5$ se ve alterado por DI-17E6. Las EC en cultivo migran por la ECM provisional, y esta migración se ve interrumpida por el DI-17E6. Los cambios morfogénicos implicados en la formación de vasos sanguíneos son complejos, pero pueden ser modelados in vitro en ensayos de migración de células endoteliales en humanos donde DI-17E6 puede bloquear este proceso. También bloquea la angiogénesis cuando se administra de manera sistemática in vivo en el modelo de quimera de ratón SCID- piel humana, y en el modelo con plug de matrigel en monos. Esto sugiere que DI-17E6 influye en los endotelios angiogénicos. Se presenta a continuación evidencia indirecta para la anti-angiogénesis. Dependiendo de si VEGFA o FGF2 es el inductor, la angiogénesis desencadenada es dependiente de $\alpha v \beta 5$ o de $\alpha v \beta 3$. Debido a que DI-17E6 bloquea ambas integrinas αv , puede bloquear ambas vías.

35 Aunque se cree que la DI-17E6 se dirige, principalmente, a las ECs, puede además inhibir el crecimiento y la supervivencia de las propias células tumorales. Hasta ahora, esto sólo ha sido demostrado para los tumores que expresan $\alpha v \beta 3$.

40 Las líneas celulares tumorales de diferentes indicaciones tumorales (melanoma, ováricos, renales, de colon, mama y pulmón), tienen su crecimiento afectado cuando son tratadas con DI-17E6 in vitro. La actividad de DI-17E6 para inducir la anti-proliferación varía en las diferentes líneas celulares, y esto puede ocurrir debido tanto a los antecedentes genéticos de cada línea celular, como al nivel de expresión de integrina αv mediante estas líneas celulares.

45 La DI-17E6 puede inhibir el crecimiento de tumores de xenoinjertos en ratones. También muestra efectos sinérgicos en combinación con reactivos quimioterápicos. Estos efectos son dependientes del contexto tumoral, y otras condiciones (por ejemplo, in vitro/ in vivo), pero se ha observado eficacia en localizaciones subcutáneas y ortotópicas, como el páncreas (ver los Ejemplos).

50 En tumores sólidos la $\alpha v \beta 3$ competente para unir ligandos es, de manera frecuente, sobre-expresada en la vasculatura invasiva del tumor y también en algunos tumores humanos, incluyendo melanomas, carcinomas renales, tumores cerebrales. Esta expresión se acompaña por el depósito de ligandos de $\alpha v \beta 3$, como vitronectina, el factor de von Willebrand y el fibrinógeno, y por la síntesis anómala de tales proteínas. Por ejemplo, la vitronectina, producida principalmente en el hígado, se expresa en algunos tumores. En adultos sanos la vitronectina y el fibrinógeno se encuentran en una forma hematógica inactiva, pero con la activación (por ejemplo en pacientes con tumores), experimentan un cambio conformacional y se depositan en la ECM sub-endotelial. De este modo, las dianas de la DI-17E6 se expresan tanto mediante vasos invasivos del tumor y mediante algunos tumores, que además expresan el receptor de la vitronectina.

El crecimiento subcutáneo de células de melanoma que expresan $\alpha\beta 3$ es suprimido por EMD 525797 en diferentes dosis. En un modelo quimérico de ratón SCID-piel humana, donde los melanomas humanos que carecen de las integrinas alfa-v fueron vascularizados por las ECs humanas, EMD 525797 también inhibe el crecimiento tumoral, indicando su efecto anti-angiogénico.

5 Más aún, en un modelo libre de tumores en monos, donde la angiogénesis es inducida por el factor de crecimiento angiogénico bFGF, DI-17E6 también bloqueó la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento. En base a las investigaciones in vivo, y de acuerdo a las concentraciones mínimas de plasma experimentales identificadas en varios estudios in vivo de PK/PD, las administraciones de EMD 525797 en ensayos clínicos incluyen la dosificación para alcanzar las concentraciones mínimas de plasma que se encuentran en un rango de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

10 Si se aplica a modelos de ratones con xenoinjerto de melanoma (M21, MeWo o CAKI-1), la DI-17E6 causa en dosis más bajas (alrededor de 30mg/Kg), un efecto de regresión tumoral ligero, mientras que el efecto es considerablemente aumentado si se administran dosis mayores (500 $\mu\text{l/ml}$).

15 Debe señalarse que las propiedades básicas biológicas y terapéuticas tal como se han especificado con anterioridad para la DI-17E6, pueden también ser aplicadas a otras variantes de DI-17E6, tal como se ha especificado en esta solicitud.

Terapia de combinación

20 Las células endoteliales proliferan e invaden el entorno tumoral en respuesta a citocinas solubles y a factores de crecimiento secretados por el tumor. Dichas células endoteliales son una diana adecuada para la terapia, como ha sido validado recientemente en pacientes de cáncer humanos. Las integrinas alfa-v expresadas de novo por tal endotelio invasivo de tumor, respaldan su supervivencia en el entorno extraño de la matriz extracelular de transición, y la inhibición de estas integrinas pueden tener un efecto anti-angiogénico.

25 De este modo, la terapia diana de la integrina αv o alfa v beta 3 presenta un marco ideal para combinar el anticuerpo de la presente invención con quimioterápicos, otros inhibidores de la integrina o agentes bloqueantes de receptores tumorales en composiciones farmacéuticas, y un kit de piezas para sus uso en la terapia de combinación contra el cáncer.

30 De manera sorprendente, se observó que el efecto directo anti-tumoral puede verse aumentado por la combinación de un anticuerpo modificado genéticamente de acuerdo a la invención, de manera preferente DI-17E6, con agentes anti-tumorales adicionales, en especial inhibidores de la tirosina quinasa, de manera preferente anticuerpos anti-erbB1(EGFR) y anti-erbB2(Her2). La terapia anti-tumoral se dirige al propio tejido tumoral bloqueando los receptores específicos tumorales, y evita de ese modo el crecimiento tumoral, o promueve la reducción del tumor.

35 De acuerdo a la presente invención, pudo demostrarse que algunos de los quimioterápicos causan, en combinación con un anticuerpo modificado genéticamente de acuerdo a la invención, de manera preferente DI-17E6, un efecto acumulativo únicamente, mientras que en otros experimentos que utilizan otros quimioterápicos (por ejemplo, Dacarbacina, DTIC), pueden observarse efectos sinérgicos. Más aún, los resultados dependen del sistema utilizado, por ejemplo si se ha tomado un sistema in vivo o uno in vitro.

Un importante resultado de los experimentos de combinación es que el uso combinado de, de manera preferente, DI-17E6 y cilegitide, un péptido RGD cíclico y un inhibidor de integrina ((cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) muestra efectos sinérgicos en la regresión del crecimiento tumoral in vitro, además de in vivo.

40 Efectos sinérgicos similares en la reducción del crecimiento tumoral pueden obtenerse si DI-17E6 se combina con cetuximab (Erbix®). Erbitux (cetuximab) es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/ratón (MAb) de la subclase IgG1 que se dirige al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés). Líneas celulares de carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés), expresan el EGFR. El Erbitux es un producto comercializado y aprobado para varias indicaciones tumorales.

45 En todos los casos de sinergia puede concluirse, a partir de los resultados, que el anticuerpo DI-17E6 modificado genéticamente refuerza el efecto anti-tumoral del segundo agente utilizado en la combinación.

De acuerdo a la invención, DI-17E6 causa, cuando se encuentra en combinación con cetuximab, una disminución constante en el tamaño/crecimiento del tumor que puede observarse durante un periodo más largo (alrededor de 40 días), incluso si la administración de los fármacos ha cesado. Este no es el caso si el cetuximab es administrado en monoterapia.

50 Los anticuerpos modificados genéticamente de acuerdo a la invención pueden ser administrados a un paciente que necesite los mismos antes, después o de forma simultánea con el segundo agente terapéutico.

5 El agente quimioterapéutico utilizado en combinación con un anticuerpo modificado genéticamente de acuerdo a la invención puede ser, por ejemplo, metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetil nitrosoureas, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbacina, taxol, fragilina, Meglamina GLA, valrubicina, carmustina, UFT(Tegafur/Uracilo), ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, Fluorouracilo (5-FU), vinblastina, y otros tantos compuestos de esta clase.

10 Las composiciones farmacéuticas o las composiciones de DI-17E6 de la invención con o sin un segundo agente terapéutico, pueden también ser utilizadas en combinación con otras estrategias anticancerígenas, y tales terapias de combinación resultan efectivas a la hora de inhibir y/o eliminar el crecimiento tumoral y la metástasis. Los métodos de la presente invención pueden ser utilizados de manera ventajosa con otras modalidades de tratamiento, incluyendo, sin limitación, la terapia de radiación, cirugía, terapia génica y la quimioterapia.

15 Se observó, de manera sorprendente, que el efecto anti-angiogénico puede verse aumentado por la combinación de un anticuerpo de acuerdo a la invención con el tratamiento con inhibidores de la angiogénesis adicionales. La terapia anti-angiogénica se dirige a la vasculatura tumoral y evita el crecimiento tumoral más allá de un cierto tamaño, de este modo en un segundo modo de realización preferente, el medicamento secundario es un inhibidor de la angiogénesis seleccionado, de manera preferente, de la siguiente lista:

20 El inhibidor de la angiogénesis puede ser, pero no se limita a, por ejemplo, cilengitide (EMD 121974), anticuerpo anti-VEGF LM609, BMS-275291, Dalteparina (Fragmin®), Suramina, 2-metoxiestradiol (2-ME), Talidomida, CC-5013 (Análogo de la Talidomida), fosfato de combretastatina A4, LY317615 (inhibidor de la Proteína quinasa C Beta), AE-941 (Neovastat™; GW786034), Anticuerpo Anti-VEGF (Bevacizumab; Avastin™), ZD6474, Carboxiamidotriazol (CAI), Celecoxib (Celebrex®).

25 Los anticuerpos de la invención pueden ser incorporados a una composición farmacéutica adecuada para su administración. Tales composiciones comprenden, de manera habitual, las regiones variables de anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente patente, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios o agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en el arte.

30 Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con la vía de administración por la que se pretende administrar. Ejemplos de vías de administración incluyen la vía parenteral, por ejemplo, vía intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (vía tópica), transmucosa, y administración por vía rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea, pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como el cloruro sódico o la dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encontrarse incluida en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples realizados en cristal o plástico.

40 Los medicamentos que contienen las regiones variables del anticuerpo de la invención pueden tener una concentración de 0.01 a 100% (porcentaje en peso), aunque la cantidad varía de acuerdo a la forma de dosis de los medicamentos.

45 La administración resulta preferente una vez cada dos semanas o una vez al mes, pero puede ser más o menos frecuente dependiendo del comportamiento farmacocinético de la proteína 17E6/425-101 en un individuo determinado. La dosificación del DI-17E6 u otros anticuerpos tal como se ha especificado en la presente solicitud (por ejemplo, cetuximab), para un adulto de aproximadamente 70 kilogramos, se encuentra en un rango de aproximadamente 50 a 1000 miligramos por dosis, con un rango preferente de aproximadamente 100 a 500 miligramos por dosis. La dosis más preferente es de aproximadamente 400 miligramos para un adulto de 70 kg tratado una vez al mes.

50 Los agentes quimioterápicos como los mencionados en la presente patente son administrados, por regla general, en dosis entre 10 mg/kg y 100 mg/kg.

En terapia de combinación con un segundo agente terapéutico, tal como se ha especificado, el anticuerpo modificado genéticamente de acuerdo a la invención puede ser proporcionado de manera simultánea con el segundo agente, en el momento del comienzo de la terapia o bien después o antes de la administración del segundo agente.

Breve descripción de las Figuras:

Figura 1A: secuencias de la cadena liviana variable de DI-17E6 (SEQ ID No. 1)

Figura 1B: secuencias de la cadena pesada variable de DI-17E6 (SEQ ID No. 2)

Figura 1C: secuencia proteica de la cadena liviana completa de DI-17E6:

5 Las regiones variables se encuentran subrayadas, con las CDR en negrita.

Figura 1D: secuencia proteica de la cadena pesada completa de DI-17E6:

Las regiones variables se encuentran subrayadas, con las CDR en negrita. Las secuencias en negrita en las regiones constantes indican la región bisagra de la IgG1 y las modificaciones en las posiciones 296 y 297.

Figura 2: la actividad anti-angiogénica de DI-17E6 en un experimento con plug de Matrigel en un mono:

10 La detección de anticuerpos en suero de mono dependiente de la concentración del fármaco en diferentes días (dosis única).

Figura 3: la actividad anti-angiogénica de DI-17E6 (EMD 525797) en un experimento con plug de Matrigel: la detección de anticuerpos en suero de mono para la dosificación de DI-17E6 (30 mg/kg) dependiente del tiempo (a largo plazo).

15 Figura 4: Los efectos de DI-17E6 en el crecimiento tumoral en el modelo de quimera de ratón SCID-piel humana con melanoma M21-L (administrado 3 veces por semana a razón de 1 mg/dosis por vía intraperitoneal durante 4 semanas, comenzando el tratamiento un día después de la inoculación de la célula tumoral).

20 Figura 5: Efectos de DI-17E6 en la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento en el modelo con plug de Matrigel en monos. Inhibición de la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento mediante EMD 525797 en monos que reciben una única administración terapéutica por vía intravenosa (10 o 30 mg/kg). El tratamiento tuvo lugar el mismo día de la implantación en Matrigel. Se utilizó un animal que contenía hasta 6 plugs de Matrigel por grupo. El análisis del contenido de hemoglobina (g de hemoglobina/mg de plug de Matrigel) se llevó a cabo después de seis días; se proporcionan medios \pm SE.

Figura 6: Efecto anti-proliferativo de DI-17E6 combinado con Paclitaxel *in vitro* que se muestra en células HUVE.

25 Figura 7: Efecto anti-proliferativo sinérgico de DI-17E6 combinado con cilengitide *in vitro* que se muestra en una línea celular de melanoma M21 humano. Curva superior: sólo cilengitide, curva inferior: DI-17E6 + cilengitide.

Figura 8: Efecto anti-proliferativo sinérgico de DI-17E6 combinado con cilengitide *in vitro* que se muestra en una línea celular renal humana CAKI-2. Curva superior: sólo cilengitide, curva inferior: DI-17E6 + cilengitide.

30 Figura 9: Efecto anti-proliferativo sinérgico de DI-17E6 combinado con cilengitide *in vitro* que se muestra en una línea celular humana A498. Curva con triángulos DI-17E6 + cilengitide, curva con cuadrados: sólo cilengitide.

35 Figura 10: Efecto *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) en el tratamiento quimioterapéutico en un modelo tumoral con xenoinjerto de cáncer pancreático ortotópico: Inhibición del tumor pancreático NP 18-b3 (fragmentos tumorales de 10 mg cosidos de manera ortotópica en el páncreas de ratones desnudos) mediante combinación de dosis inferiores a las óptimas de EMD 525797 y gemcitabina a diferentes dosis. El tratamiento comenzó 6 días después de la cirugía de fragmentos tumorales. EMD 525797 fue administrado tres veces por semana por vía intraperitoneal a 500 μ g/dosis. La gemcitabina fue administrada tres veces por semana por vía intraperitoneal a 50 μ g/kg. El peso del tumor se encuentra representado después de 42 días.

40 Figura 11: Efecto *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) en el tratamiento combinado con cisplatino (cPT) de modelos tumorales de xenoinjerto utilizando células tumorales M21 humanas trasplantadas en ratones, utilizando dosis inferiores a las óptimas de DI-17E6. El tratamiento con cPT comenzó en el día 11 después de la inyección de células tumorales. Se administró EMD 525797 una vez por semana por vía intraperitoneal a 500 μ g/dosis. Se administró cPT una vez por semana por vía intraperitoneal a 10 mg/kg.

45 Figura 12: Efecto *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) en tratamiento combinado con darcabacina (DTIC) de modelos tumorales de xenoinjertos utilizando células tumorales MeWo humanas trasplantadas en ratones, utilizando dosis inferiores a las óptimas de DI-17E6. Tratamiento para EMD 525797 comenzó el mismo día que la inyección de

células tumorales. El tratamiento de DTIC comenzó en el día 11 después de la inyección de células tumorales. Se administró EMD 525797 una vez por semana por vía intraperitoneal a 500 µg/dosis. Se administró DTIC una vez por semana por vía intraperitoneal a 50 mg/Kg.

5 Figura 13: Efecto in vivo de DI-17E6 (EMD 525797) sólo en modelos tumorales de xenoinjertos utilizando células tumorales de carcinoma renal CAKI-1 humanas trasplantadas en ratones utilizando dosis diferentes (µg /ml de suero) de DI-17E6. Eje-y: volumen tumoral (mm³), eje-x: días.

10 Figura 14: Efecto in vivo de DI-17E6 (EMD 525797) en tratamiento combinado con cetuximab (Erbix) en células tumorales de carcinoma renal CAKI-1 trasplantadas en ratones utilizando DI-17E6 en una concentración en suero constante de 100 µg/ml y Erbitux en dosis de 4 mg/Kg y 12 mg/Kg de peso corporal. El régimen de dosis se representa en el Ejemplo 13. Eje-y: volumen tumoral (mm³), eje-x: días.

Figura 15: Mapa plasmídico del plásmido de expresión de DI-17E6 pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q).

Figura 16: Estructura esquemática de mAb DI-17E6 (EMD 525797).

15 Figura 17 A: La secuencia de ADN completa de DI-17E6 desde el codón de iniciación de la traducción hasta el codón de terminación de la traducción de la cadena liviana completa (kappa humana) tal como se utiliza en el plásmido de expresión pdHL10-DI-17E6 (secuencia de codificación en letras mayúsculas y secuencia de no codificación en letras minúsculas, secuencia variable y constante en color gris, secuencia variable en cursiva) (SEQ ID No. 27)

Figura 17 B: La secuencia de ADN de la cadena liviana variable de DI-17E6 (SEQ ID No. 29)

Figura 17 C: La secuencia de ADN de la cadena liviana constante de DI-17E6 (SEQ ID No. 31)

20 Figura 18 A: La secuencia de ADN completa de DI-17E6 desde el codón de iniciación de la traducción hasta el codón de terminación de la traducción de la cadena pesada completa tal como se utiliza en el plásmido de expresión pdHL10-DI-17E6 (secuencia de codificación en letras mayúsculas y secuencia de no codificación en letras minúsculas, secuencia variable y constante en color gris, secuencia variable en cursiva; región bisagra de la IgG1 modificada en negrita) (SEQ ID No. 33).

25 Figura 18 B: La secuencia de ADN de la cadena pesada variable de DI-17E6 (SEQ ID No. 35)

Figura 18 C: La secuencia de ADN de la cadena pesada constante de DI-17E6 (SEQ ID No. 37)

Figura 18 D: La secuencia de ADN de la región bisagra de la IgG1 modificada de la cadena pesada de DI-17E6 (SEQ ID No. 39)

Figura 19 A: La secuencia de ADN completa de la cadena pesada de DI-17E6 (SEQ ID No. 41)

30 Figura 19 B: La secuencia de ADN de la cadena liviana completa de DI-17E6 (SEQ ID No. 43)

Figura 20 A: La secuencia proteica de la cadena liviana variable del anticuerpo de ratón 17E6. Las secuencias en negrita representan las CDRs. (SEQ ID No. 25).

Figura 20 B: La secuencia proteica de la cadena pesada variable del anticuerpo de ratón 17E6. Las secuencias en negrita representan las CDRs. (SEQ ID No. 26).

35 Figura 21A: Ensayo ELISA de unión de la integrina de diferentes versiones de anticuerpos modificados genéticamente.

cruz (x) = 17E6 VH/425VL-g2h(N-Q)

asterisco (*) = mAb 425

triángulo = DI 17E6 VH33/VL60.2-g2h(N-Q)

40 rombo = 17E6- g2h(N-Q)

Figura 21B: Ensayo ELISA de unión de la integrina de diferentes versiones de anticuerpos modificados genéticamente.

triángulo con relleno: 17E6-g2h(N-Q) murino

triángulo: DI-17E6VL60.2CDR-425VLF^{FR4}/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)

5 cuadrado con relleno: DI-17E6VL60.2CDR-425VLF^{FR3FR4}/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)

círculo con relleno: DI-17E6-g2h (N-Q)(C60Y)

10 Los siguientes ejemplos describen la invención en mayor detalle. Sin embargo, aunque utiliza parámetros, moléculas, pasos de método, etc., específicos, la invención no está limitada por los mismos, si un experto en el arte puede concluir fácilmente a partir de estos datos que la invención puede ser llevada a cabo con medios y métodos análogos.

Ejemplo 1:

Construcción y expresión de los anticuerpos modificados genéticamente de acuerdo a la invención:

A fin de reducir la inmunogenicidad en humanos, el DI-17E6 (EMD 525797) fue realizado mediante desinmunización y modificación por ingeniería genética del 17E6 murino.

15 El anticuerpo fuente fue el anticuerpo de ratón monoclonal 17E6 tal como se describió anteriormente. Este anticuerpo fue generado a partir de ratones inmunizados con $\alpha\beta 3$ humana purificada. Se fusionaron linfocitos del bazo de ratones inmunizados con células de mieloma murino, y uno de los clones de hibridomas resultantes produjo el anticuerpo 17E6 (ver, por ejemplo, la EP0719859). La línea celular hibridoma que produce dicho anticuerpo fue depositada bajo la referencia DSM ACC2160.

20 En principio, las regiones variables de las cadenas liviana (VL) y pesada (VH) del 17E6 murino fueron analizadas in silico con la así denominada metodología de desinmunización (WO 98/52976, WO 00/34317 y WO 02/069232) para eliminar los epítomos de linfocitos T potenciales. Las secuencias de VH y VL desinmunizadas fueron designadas para retener los aminoácidos de la secuencia murina que son críticos para la unión, tales como las CDRs.

25 Utilizar esta tecnología en solitario condujo a un anticuerpo, que mostró inmunogenicidad eliminada o reducida en un individuo humano, pero no mostró suficiente afinidad de unión y tasas de expresión satisfactorias en un sistema de expresión mamífero. De este modo, el anticuerpo ha sido rediseñado mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos en varias posiciones para reinstalar la afinidad de unión y la expresión. Sin embargo, resultó obvio que mientras que mejoraba el patrón de expresión la afinidad de unión disminuyó y viceversa. De este modo, tenían que construirse un gran número de versiones de anticuerpos, que se investigaron para la expresión y afinidad de unión. La nueva versión muestra a menudo resultados sorprendentes, los cuales no se esperaban cuando el diseño de la molécula fue planeado. Combinar secuencias de una versión de anticuerpo que muestra buena expresión con secuencias de versiones de anticuerpo que muestran buena afinidad de unión, a menudo da como resultado nuevas versiones de anticuerpos que presentan una mala afinidad de unión y expresión. Por lo tanto, como ya se ha señalado, la predicción sobre qué mutaciones de anticuerpos específicas provocaron buena expresión y afinidad de unión no fue posible.

Regiones variables de 17E6 (DI-17E6) desinmunizado:

40 Las regiones variables de las cadenas liviana (VL) y pesada (VH) del anticuerpo monoclonal de ratón 17E6 (SEQ. ID Nos. 25 and 26) fueron desinmunizadas in silico mediante tecnología de desinmunización tal como se ha especificado con anterioridad, lo que eliminó los epítomos de linfocitos T colaboradores potenciales. Esto dio como resultado una versión desinmunizada de la VL denominada VL60.2 y una versión desinmunizada de la VH denominada VH33.

El anticuerpo 17E6 desinmunizado que consistía en la VL60.2 y VH33 producidas por transfección de células mamíferas, mantuvo la afinidad de unión a la integrina $\alpha\beta 3$ pero fue expresado de manera deficiente.

45 Para optimizar la expresión, las regiones armazón de la cadena liviana fueron reemplazadas por aquellas de un anticuerpo 425 humanizado (Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773, 1991). Más aún, la cisteína-60 no emparejada en la VH33, que era rara entre las secuencias VH fue convertida a tirosina (C60Y) para proporcionar estabilidad proteica.

La ADN que codifica la VL final desinmunizada VL (DI-17E6 VL, Fig. 1A) y VH (DI-17E6VH, Fig. 1A), fueron sintetizadas químicamente, utilizando codones optimizados para la expresión mamífera.

Origen y fuente de la línea celular NS0-LD:

5 La NS0 de mieloma de ratón se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC #85110503). La línea celular NS0-LD se obtuvo mediante la selección de células NS0 para el cultivo en un medio libre de suero y libre de lípidos, que consiste en un medio SM1F6 (Invitrogen) complementado con 1 nM de piruvato de sodio (Invitrogen), 1 g/L de glucosa (Merck KGaA), 1% de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 0.1 μ M de Tropolona (Sigma), y 2 mM de glutamina (Invitrogen). Se prepararon existencias congeladas de NS0-LD en un medio de congelación que consiste en 10% (v/v) de DMSO filtrado (Merck KGaA), 10% (v/v) de una suspensión al 1% de metilcelulosa en agua (Sigma), 40% de un medio de crecimiento fresco y 40% de un medio condicionado de las células NS0-LD.

15 Construcción del vector de expresión para DI-17E6 γ 2h(N297Q). Se utilizó una secuencia peptídica señal genómica (438-bp) de un gen de la cadena liviana de inmunoglobulina de ratón para la secreción de ambas cadenas, la liviana y la pesada. La secuencia génica que codifica el residuo aminoácido -2 (siendo el aminoácido -1 el residuo C-terminal del péptido señal), del péptido señal fue mutagenizado a partir de un residuo de serina a un residuo de leucina (AGC a TTA), de manera que el ADN que codifica el extremo del péptido señal es CTTAAGC, donde CTTAAGC es un sitio *Afl*II creado (Lo et al., Protein Engineering 11:495, 1998). Además, la secuencia de consenso de Kozak CCACCATGG fue introducida para la unión óptima del ribosoma para la iniciación de la traducción en ATG (Kozak, Cell 44:283, 1986). Esto se logró mediante la mutación del primer residuo de aminoácidos después del codón de iniciación desde AAG hasta GAG para proporcionar la secuencia TCTAGACCACCATGGAG, donde la secuencia de consenso de Kozak se encuentra subrayada y TCTAGA es un sitio *Xba*I. Por lo tanto, el péptido señal contiene una sustitución en el primer residuo aminoácido después del codón de iniciación, y otra sustitución en el residuo aminoácido en la posición -2. Debido a que el péptido señal se divide mediante la peptidasa señal del interior de la célula y no aparece en la proteína secretada, estas mutaciones no afectan a la composición de aminoácidos del producto de anticuerpo.

20 El ADN VL desinmunizado se sintetizó como el fragmento *Afl*II-*Bam*HI, y el ADN VH se sintetizó como el fragmento *Afl*II-*Hind*III. Para la VL, el ligamiento al líder genómico a través del sitio *Afl*II dio como resultado un fragmento *Xba*I-*Bam*HI que codifica el péptido señal-VL. De manera similar, el ligamiento del ADN VH al líder genómico a través del sitio *Afl*II dio como resultado un fragmento *Xho*I-*Hind*III que codifica el péptido-VH señal, donde *Xho*I es sustituido por *Xba*I mediante el ligamiento del conector. Los fragmentos *Xba*I-*Bam*HI y *Xho*I-*Hind*III se insertaron entonces en el vector de expresión pdHL10 (Fig. 15), que ya contiene elementos de regulación de la transcripción y las secuencias de la región constante de inmunoglobulina (ver más adelante).

Constructos de ADN que codifican la región constante humana

35 Para la cadena liviana, se utilizó la región genómica constante kappa humana. Para la cadena pesada, se utilizaron las regiones genómicas constantes gamma-2 (γ 2) humanas, con las siguientes modificaciones:

40 En primer lugar, debido a que la región bisagra de la inmunoglobulina γ 2 contiene cuatro enlaces disulfuro de cisteína, lo que conduce a una aleatorización de disulfuro aumentada y a la aglutinación de proteínas durante la purificación, se sustituyó mediante ingeniería genética utilizando una región bisagra de γ 1 tal como sigue a continuación. La construcción del ADN Fc γ 2h que codifica la región bisagra de γ 1, seguida de las regiones CH2 y CH3 de la γ 2 ya han sido descritas (Lo et al. Protein Engineering, Design & Selection, 18:1, 2005).

45 Para sustituir el exón de la región bisagra de la γ 2 en el gen de la Ig γ 2 con el exón de la región bisagra de la γ 1, utilizamos una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para volver a introducir el sitio de restricción *Pst*I inmediatamente aguas arriba (upstream) del exón de la región bisagra, utilizando el ADN Fc γ 2h como modelo. El cebador directo tiene la secuencia 5'-ctgcagAGCCCAAATCTTC, donde ctgcag es el sitio *Pst*I presente, de manera originaria, en el extremo del intrón (letras minúsculas), donde ag es el sitio aceptor de corte y empalme, y AGCCCAAATCTTC es el extremo 5' del exón de la región bisagra de la γ 1 modificada (letras mayúsculas). El cebador inverso tiene la secuencia 5'-cagctggggcctgtccctg, la cual hibridiza a una secuencia en el intrón entre la región bisagra y los exones de CH2. El producto 130-bp *Pst*I-*Pvu*II PCR que contiene el exón de la región bisagra de la γ 1 modificada, después de la clonación y la verificación de secuencia, se utilizó para sustituir el correspondiente fragmento en el gen de la Ig γ 2 en el vector de expresión pdHL10 (ver más adelante).

50 En segundo lugar, se introdujo una mutación de Asn-297 en el dominio CH2 a Gln (N297Q), mediante solapamiento de PCR para eliminar la señal de N-glicosilación, la cual suprime las funciones efectoras y prolonga la vida media en suero del anticuerpo. Además, Phe-296 fue mutado a Ala, lo que elimina cualquier epítipo de linfocitos T colaboradores potenciales creados por la mutación N297Q. En tercer lugar, existe un sitio de restricción *Sma*I situado aproximadamente 280 bp aguas arriba del codón de terminación de la traducción en la secuencia de ADN de

tipo silvestre que codifica el dominio CH3. Este sitio SmaI se destruyó mediante la introducción de una mutación silenciosa (TCC a TCA). Otra mutación silenciosa se introdujo para crear un sitio SmaI nuevo y único 4 bp aguas arriba del codón de terminación (Lo et al. Protein Engineering 11:495, 1998) para facilitar la manipulación genética.

Construcción del plásmido pdHL 10 (Figura 15)

- 5 El vector de expresión pdHL10 se deriva de pdHL7, que ha sido descrito previamente (Gillies et al. J. Immunol. 160:6195, 1998). Como en el pdHL7, las dos unidades de transcripción para las cadenas L y H en el pdHL10 contienen el potenciador-promotor del CMV (citomegalovirus) (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985). El ADN para el potenciador-promotor del CMV se obtuvo del fragmento AfIII-HindIII del pcADNI disponible comercialmente (Invitrogen Corp., San Diego, CA).
- 10 La diferencia más importante entre el pdHL7 y el pdHL10 se encuentra en la unidad de transcripción para el marcador de selección de la dihidrofolato reductasa (DHFR). El potenciador de SV40 para esta unidad de transcripción fue destruido en pdHL10 tal y como sigue a continuación. Existen dos repeticiones de 72-bp en el potenciador/promotor del SV40, y dentro de cada 72 bp existe un sitio de restricción. El ligamiento del sitio Sall 5' del potenciador al sitio SphI distal a través de un adaptador-conector oligonucleótido, dio como resultado la delección de 120 bp de las dos repeticiones de 72-bp. Un promotor sin potenciador de tales características debería proporcionar un nivel de expresión mucho menor del marcador de selección de DHFR. Esto, en teoría, debería dar como resultado menos clones de células, transfectadas de manera estable, que, a fin de sobrevivir a la selección del fármaco, podrían tener el plásmido integrado en una región de transcripción activa de un cromosoma, de manera que se expresó suficiente DHFR se expresara a partir del promotor sin potenciador. Los genes de interés, impulsados por promotores y potenciadores totalmente funcionales, deberían expresarse a incluso niveles más elevados en esta región de transcripción activa. Además, la orientación de esta unidad de transcripción atenuada se encontraba invertida en pdHL10, de manera que el potenciador de CMV para la cadena L no pueda ejercer un efecto directo en el promotor de SV40 distal.
- 15
- 20
- 25 El constructo pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) fue ampliamente mapeado mediante digestiones de endonucleasa de restricción (Figura 15). Las regiones de codificación de la totalidad de las cadenas L y H fueron secuenciadas al completo. Sus características destacadas se describen en la siguiente Tabla:

Par de Bases (Bp) #	Descripción	Literatura	Fuente de la Información de secuencia
0002 (EcoRI) - 0665 (XbaI)	Promotor y potenciador de CMV	Boshart M et al. (1985), Cell 41, 521-530	Locus <i>HS51EE</i> , Accesión <i>k03104</i> Secuencia confirmada en EMD Lexigen
0665 (XbaI) - 1112	Líder genómico de una cadena L de inmunoglobulina de ratón	Schaeble KF et al. (1999), Eur. J. Immunol. 29, 2082-2086	Locus <i>MMU231201</i> , Accesión <i>AJ231201</i> ; Secuencia de codificación confirmada en EMD Lexigen, excepto 6 variaciones nt en el intrón ¹
1113 - 1434	17E6 VL desinmunizado	Se proporciona en la Figura 1A	Secuencia confirmada en EMD Lexigen
1435 (BamHI at 1442)-1784	Intrón entre VL y CL	Kawasaki K (2001), Eur. J. Immunol. 31, 1017-1028	NG_000834 en el Genbank; Secuencia confirmada en EMD Lexigen

Tabla 1 (continuación)

Par de Bases (Bp) #	Descripción	Literatura	Fuente de la Información de secuencia
2108 - 2971 (Sall)	región 3' no traducida y señal de poliadenilación del gen de la cadena kappa de inmunoglobulina humana	Kawasaki K (2001), Eur. J. Immunol. 31, 1017-1028	NG_000834 en el Genbank; Secuencia confirmada en EMD Lexigen
2971 (Sall) - 3638 (XhoI)	Promotor y potenciador de CMV	Boshart M et al. (1985), Cell 41, 521-530	Locus <i>HS51EE</i> , Accesión <i>K03104</i> ; Secuencia confirmada en EMD Lexigen,
3638 (XhoI) - 4091	Líder genómico de una cadena L de inmunoglobulina de ratón	Schauble KF et al. (1999), Eur. J. Immunol. 29, 2082-2086	Locus <i>MMU231201</i> , Accesión <i>AJ231201</i> ; Secuencia de codificación confirmada en EMD Lexigen, excepto 6 variaciones nt en el intrón ²
4092 - 4446	17-E6 VH desinmunizada	Se proporciona en la Figura 2	Secuencia confirmada en EMD Lexigen
4447 (HindIII at 4454) - 6264	Regiones constantes del gen 02 de inmunoglobulina con región bisagra □I modificada	Krawinkel U. et al. (1982), EMBO J. 1 (4), 403-407	Locus <i>HUMIGCDI</i> , Accesión <i>J00230 V00554</i> ; Secuencia de codificación confirmada en EMD Lexigen, excepto 4 variaciones nt en el intrón ³⁻⁵
6265 (XhoI at 6266) - 6515	región 3' no traducida y señal de poliadenilación de la región tardía de SV40	Forsman ZH et al. (2004), J. Virol. 78, 9306-9316	Accesión <i>AF316141</i> ; Secuencia confirmada en EMD Lexigen
6516 - 8809 (EcoRI)	Origen de la replicación y gen de la lactamasa-β de pBR322	Sutcliffe JG (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3737-3741	Accesión <i>J01749</i> ; Secuencia parcialmente confirmada (6516 a 7192) en EMD Lexigen
8809(EcoRI) - 9038	Promotor de SV40	Ilyinskii PO et al, (1992) J. Virology 66,6353-6360.	<i>M99359.1 GI:310698</i> ; en Genbank; Secuencia confirmada en EMD Lexigen
9039 - 9602	DHFR cADN	Simonsen CC and Levinson AD (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 2495-2499	Secuencia confirmada en EMD Lexigen
9603 - 9687	región 3' no traducida de DHFR fusionada a la señal de poliadenilación de la región temprana de SV40 a través de el ligamiento del extremo cohesivo de Bgl II al extremo cohesivo de Bcl I	Strausberg RL (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903	Accesión <i>BC005796</i> ; Secuencia confirmada en EMD Lexigen

Tabla 1 (continuación)

Par de Bases (Bp) #	Descripción	Literatura	Fuente de la Información de secuencia
9688 - 9924	Señal de poliadenilación de la región temprana de SV40	Forsman ZH et al. (2004), J. Virol. 78, 9306-9316	Accesión AF316141; Secuencia confirmada en EMD Lexigen
<p>1. Se observaron seis variaciones de nucleótidos (nt) en el intrón del líder entre el vector pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) y las secuencias publicadas. El vector pdHL10-DI-17E6(C60Y)γ2h(N297Q) contiene G en 801, T en 985, C en 993, T en 1006, T en 1045 y A en 1071. La secuencia publicada contiene C, A, A, G, AC (un nt adicional), y G en estas posiciones respectivas.</p> <p>2. Se observaron seis variaciones de nucleótidos (nt) en el intrón del líder entre el vector pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) y la secuencia publicada. El vector pdHL10-DI-17E6(C60Y)γ2h(N297Q) contiene G en 3780, T en 3964, C en 3972, T en 3985, T en 4024 y A en 4050. La secuencia publicada contiene C, A, A, G, AC (un nt adicional), y G en estas posiciones respectivas.</p> <p>3. Se observaron dos variantes de nucleótidos (nt) en el intrón entre CH2 y CH3 entre el vector pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) y la secuencia publicada. El vector pdHL10-DI-17E6(C60Y)γ2h(N297Q) contiene A en 5908 y A en 59722. La secuencia publicada contiene G en ambas posiciones respectivas.</p> <p>4. Se observó una variante de nucleótido (nt) en el CHI entre el vector pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) y la secuencia publicada. El vector pdHL10-DI-17E6(C60Y)γ2h(N297Q) contiene G en 4736. La secuencia publicada contiene C en esta posición.</p>			

Generación de la producción de clones de células y bancos de células para la investigación

Transfección y selección de clones de alta producción

- 5 El plásmido de expresión pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) linearizado mediante la endonucleasa de restricción FspI, que se corta una vez en la secuencia que codifica la β-lactamasa, se utilizó para transfectar células NS0-LD mediante electroporación. La electroporación se llevó a cabo utilizando un sistema de Gene Pulser Xcell™ (BioRad, Hercules, CA) con configuraciones a 250 voltios y 15 ms de longitud de pulso. Los clones transfectados de manera estable se seleccionaron mediante cultivo en medio Super CD complementado para contener 200 nM de metotrexato (Sigma, Cat. No. M-8407). El medio super CD contiene 9.69 g/L de un medio de hibridoma AGT CD (Invitrogen, P/N RM-00-136), 2.52 g/L de bicarbonato de sodio (EMD, P/N SX0320-3), 30ml/L de Concentrado de ácido soluble CD (Invitrogen, P/N 00-0336DK), 1.46 g/L de L-glutamina (Sigma, P/N G8540), 3 g/L de glucosa (Sigma, P/N G-5400), 2 g/L de Select Soytone de BD (Becton Dickenson, P/N 212488), y 2 g/L de Select Phytone ultrafiltrado de BD (Becton Dickenson, P/N 210931). Los sobrenadantes de aproximadamente 474 clones estables de doce placas de 96 pocillos, se sometieron a ensayo mediante ELISA anti-Fc humana para identificar grandes productores. Los niveles de expresión de los clones seleccionados se confirmaron en mayor detalle por cromatografía de afinidad con Proteína A recombinante (rPA). El clon #395, que produjo 607 μg/ml de DI-17E6γ2h(N297Q) (por rPA) en cultivo estacionario terminal en un matraz en T de 25 cm², fue elegido para la subclonación mediante diluciones de limitación.
- 20 Los intentos para subclonar en un medio Super CD no tuvieron éxito. Por lo tanto, el clon #395 se adaptó para su cultivo en un medio DMEM/F12 (Invitrogen, cat. # 21041-025) complementado para contener 5 μM de Tropolona (Sigma, cat. # T7387), 10 mL/L de etanolamina (Sigma, cat. # E0135), 10 mg/mL de insulina (bovina, liofilizada, Invitrogen, Cat. No. 13007-018), 2 g/L de Hypep 4601 (Quest International, cat. # 5Z10419) y 2 g/L de Hypep 1510 (Quest International, cat. # 5X59053), 3.5 mM de L-glutamina (Invitrogen, Cat. No. 25030-081), y 200 nM de metotrexato (Sigma, Cat. No. M-8407) para un pasaje, y se subclonó en una mezcla al 1:1 del medio DMEM/F12 completo con 200 nM de metotrexato y un medio DMEM/F12 completo condicionado (condicionado a partir de un cultivo de las células NS0-LD hospedadoras no transfectadas, centrifugado y después filtrado). Para la subclonación, las células se colocaron en placas a razón de 1, 5, 10 células/pocillo en placas de 96 pocillos. En aproximadamente dos semanas, aparecieron subclones en las placas que contenían 10 y 5 células/pocillo. Los subclones en los pocillos fueron inspeccionados bajo el microscopio para asegurar que sólo existía un clon visible en el pocillo. Los sobrenadantes de 16 subclones de las placas de 96 pocillos (10 células/pocillo) y 1 subclon de las placas de 96 pocillos (5 células/pocillo) se sometieron a ensayo por ELISA anti-Fc humana y los clones de producción elevada se eligieron para un análisis de rPA. Los mejores subclones fueron #395-2 y #395-6, produciendo 669 μg/ml y 735 μg/ml de DI-17E6γ2h(N297Q) (por rPA) en el cultivo estacionario terminal en matraces en T de 75 cm².

Expresión del anticuerpo

5 Los plásmidos de expresión de mamíferos se construyeron, se transfectaron en células NS/0, y los transfectantes estables se aislaron. De manera habitual, las células NS/0 fueron transfectadas de manera estable con un vector de expresión y se introdujeron en un cultivo de 75 mililitros en un matraz en T y se cultivaron durante tres días, de tal manera que la densidad celular era de aproximadamente 400,000 células por mililitro. Bajo estas condiciones, la concentración de DI-17E6 secretado fue de alrededor de 50 – 100 microgramos/ml.

Purificación del anticuerpo

10 El anticuerpo puede ser purificado utilizando, en secuencia, algunos o todos los siguientes pasos: cromatografía en columna de resinas Mixta Abx, cromatografía de Proteína A recombinante, y cromatografía en columna de Q Sefarosa, seguida por diafiltración de flujo tagencial Pelicon 2 para intercambiar el tampón por un tampón de formulación. Los pasos de inactivación y eliminación del virus se encuentran interdigitalizados en estos pasos. Los pasos de inactivación y eliminación del virus no son necesarios para la purificación per se, pero se utilizan para satisfacer consideraciones normativas.

15 Un ensayo para determinar la unión del anticuerpo DI17E6 a la subunidad del receptor de integrina alfa V. La capacidad del anticuerpo DI17E6 para unirse a la integrina alfa V fue sometida a ensayo utilizando un análisis ELISA. Brevemente, varias cantidades de anticuerpo se añadieron a los pocillos que contenían la integrina alfa V, los pocillos se lavaron entonces, y el anticuerpo enlazado se sometió a ensayo con procedimientos estándar.

Ejemplo 2:

20 Generación de una diversidad de las mutaciones de anticuerpo para encontrar los patrones de expresión y afinidad de unión óptimos.

El resumen de datos sobre el aumento del nivel de expresión de DI-17E6 mediante reingeniería.

Problema en la expresión: Los niveles de expresión de las versiones desinmunizadas fueron aún más bajos que los del compuesto químico:

	Transitorio en PER.C6	NS0 de ECACC	NS0-LD
ch17E6-g2h, g4h and g4h(NtoQ)	~3-4 ug/ml	~15 ug/ml	ND
delmm17E6 VH33-VL60.2-g2h(FNtoAQ)	0.3 ug/ml	~1 mcg/ml (96-pocillos)	~1.6 ug/ml
delmm17E6 VH33-VL49-g2h(FNtoAQ)	0.7 ug/ml	-3 ug/ml	~10 ug/ml

25 Para aumentar el nivel de expresión de delmm17E6 VH33-VL49/VL60.2-g2h(FN to AQ), se realizaron las mutaciones:

- a.) C60 a S e Y en la CDR2 de la VH.
- b.) GEAA de nuevo a DGTV en la VL para restaurar una red de enlace Hpero un linfocito T potencial débil.
- c.) reversión de V20M en la VH

30 Los resultados de dos conjuntos de transfección transitoria se resumieron a continuación:

Nivel de expresión del mutante Delmm 17E6 (C60S) versus otro 17E6 (transfección transitoria en PER,C6, 24 ug en placas de 10 cm):

	Día 1	Día 4
Delmm 17E6[VL49/VH33(C60S)]-g2h(FN->AQ) #15	15.7 ng/ml	956 ng/ml
Delmm 17E6[VL49/VH33(C60S)]-g2h(FN->AQ) #16	13.1 ng/ml	734 ng/ml

ES 2 395 799 T3

	Día 1	Día 4
Delmm 17E6[VL49/VH33]-g2h(FN->AQ) #44 (control DI)	12.4 ng/ml	631 ng/ml
Delmm 17E6[VL60.2/VH33]-g2h(FN->AQ) #1 (control DI)	8.3 ng/ml	589 ng/ml
17E6-g4h(FN->AQ) #1 (control quimérico)	174 ng/ml	2716 ng/ml
17E6-g2h #6 (control quimérico)	149 ng/ml	3582 ng/ml

Niveles de expresión de los mutantes Delmm 17E6 (transfección transitoria en PER.C6, 24 ug en placas de 10 cm):

	Día 2	Día 4
Delmm 17E6[VL49(GEAA->DGTV)/VH33]-g2h(FN->AQ) #1	192 ng/ml	1187 ng/ml
Delmm 17E6(VL60.2(GEAA->DGTV)VH33]-g2h(FN->AQ) #20	120 ng/ml	949 ng/ml
17E6-g2h #66 (control quimérico)	271 ng/ml	1442 ng/ml
Delmm 17E6[VL60.2/VH33]-g2h(FN->AQ).#1 (control DI)	65 ng/ml	883 ng/ml

Transfecciones con ADN miniprep:

Delmm 17E6[VL49/VH33(V20M)]-g2h(FN->AQ) #5(mini, 40ul)	5 ng/ml	0.77 ng/ml
Delmm 17E6[VL49/VH33(C60Y)]-g2h(FN->AQ) #10(mini, 40ul)	119 ng/ml	745 ng/ml

5 El C60S presenta únicamente una mejora mínima, mientras que el resultado del C60Y es prometedor. Si el resultado del C60Y entra en acuerdo con el ADN maxiprep, cuyas transfecciones han sido realizadas, habrá que asegurarse de que no existe ninguna pérdida en la afinidad de unión. La reversión de GEAA a DGTV mejoró la expresión en aproximadamente 0.5 veces hasta 2 veces. El resultado de V20M con ADN miniprep no es fiable, pero la transfección ha sido repetida con ADN maxiprep.

10 Mejorar la expresión de delmm17E6: los siguientes nuevos constructos fueron utilizados para transfectar células NS0:

pdHL10-DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)

pdHL10-DI-17E6[VH33(C60Y)/VL60.2(DGTV)]- g2h(FN->AQ)

pdHL10-DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)

15 pdHL10-DI-17E6[VH33(C60S)/VL60.2 (DGTV)]- g2h(FN->AQ)

pdHL10-17E6-g2h(FN-AQ) (Este fue producido para comparar el nivel de expresión con 17E6g2h.)

Prueba para la expresión transitoria en PER.C6 mediante HuFc-ELISA	Día 2	Día 7
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)	304	2518 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL60.2(DGTV)]- g2h(FN->AQ)	233	1674 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)	433	2734 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60S)/VL60.2 (DGTV)]- g2h(FN->AQ)	467	3138 ng/ml
17E6-g2h(FN-AQ) (control quimérico)	587	5425 ng/ml
17E6-g2h (control quimérico)	537	3683 ng/ml
DI-17E6[VH33/VL60.2]- g2h(FN->AQ) (control DI)	48	669 ng/ml

(continuación)

Prueba para la expresión transitoria en PER.C6 mediante HuFc-ELISA	Día 2	Día 7
DI-17E6[VH33/VL60.2(DGTV)]- g2h(FN->AQ)	142	1302 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49]- g2h(FN->AQ)	371	1535 ng/ml

5 Los datos del ensayo ELISA mostraron que los niveles de expresión de 17E6-g2h(FN-AQ) y 17E6-g2h resultaron comparables. De manera sorprendente, los niveles de expresión de las combinaciones de (C60S)/(DGTV) fueron más elevados que los de (C60Y)/(DGTV), mientras que los resultados anteriores mostraron que C60Y y DGTV, individualmente, aumentaron el nivel de expresión de Delmm17E6 de 1 x a 2-3x, mientras que el C60S presenta beneficios mínimos.

Se realizó 17E6VH/425VL-g2h(FN a AQ) y las siguientes transfecciones transitorias:

	Fc ELISA
17E6VH/425VL-g2h(FN to AQ) en triplicados:	28.5, 26.7, 18.7 ug/ml
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49(DGTV)]-g2h(FN->AQ) en duplicados	2.1, 1.7
DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGTV)]-g2h(FN->AQ) en duplicados	2.7, 1.7
17E6-g2h(FN->AQ) in duplicates (control quimérico)	4.9, 4.0
425EU Ab in duplicates (control 425)	27.4, 20.0

10 Claramente, cambiar la VL aumentó el nivel de expresión hasta el del 425 Ab!

Desafortunadamente, el 17E6VH/425VL-g2h(FN to AQ) no enlazó la avb3 en el ensayo ELISA de unión (ver la Figura 21).

Para solucionar el problema de expresión/ unión, se construyeron las siguientes moléculas:

Sustituciones de T8P y A44P en delmm17E6 VL:

DI-17E6 VL60.2(DGTV) con **T8P** / DI-17E6 VH33(C60Y) -g2h(FN to AQ)
 DI-17E6 VL60.2(DGTV) con **A44P** / DI-17E6 VH33(C60Y) -g2h(FN to AQ)
 DI-17E6 VL60.2(DGTV) con **T8P** / DI-17E6 VH33(C60S) -g2h(FN to AQ)
 DI-17E6 VL60.2(DGTV) con **A44P** / DI-17E6 VH33(C60S) -g2h(FN to AQ)

15 Las células fueron transfectadas, aunque los constructos finales están siendo confirmados mediante la secuenciación (ya que la digestión de restricción no puede distinguir recombinante de parental). La combinación de T8P y A44P puede ser necesaria. Se injertaron las CDRs de 17E6 delmmVL en ls FRs de delmm425 VL. Los niveles de expresión de delmm425VL/delmm17E6 VH se sometieron a prueba, ya que delmm425 VL no pueden ser expresado al mismo nivel elevado que hu425 VL. Se utilizó el DI-425VL1, pero con una reversión de P a L (el VL1 no se unió).
 20 Por consiguiente, la reversión de P a L en CDR3, se realizó para restaurar la unión. Se emparejó con delmm17E6 VH33 (constructo a más adelante) y con ch17E6 VH (constructo b más adelante). Se realizaron las transfecciones transitorias utilizando los controles Hu425VL / ch17E6 VH (constructo c más adelante), y ch17E6.

Constructos	Expresión transitoria por ELISA Fc
a.) DI-425VL1(P a L) / delmm17E6 VH33-g2h(FN a AQ)	25
b.) DI-425VL1(P a L) / ch17E6 VH-g2h(FN a AQ)	69
c.) Hu425VL / ch17E6 VH-g2h(FN a AQ)	8394
d.) 17E6-g2h(FN a AQ)	643

ES 2 395 799 T3

Los resultados transitorios mostraron que mientras (c) ofrecía un nivel de expresión muy elevado, los constructos a y b con DI-425VL ofrecían niveles incluso menores que los de ch17E6.

NS0-LD clones de producción con

pdHL10-425VLFrs/DI17E6VL60.2CDRs/17E6VH33(C60S)-g2h(FN->AQ)-Ab y

5 pdHL10-425VLFrs/DI-17E6VL60.2CDRs/17E6VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)-Ab.

Los injertos con (FR1+FR2 únicamente) no se expresan bien y se unen de manera deficiente, mientras que los injertos con (FR3+FR4) únicamente se expresan bastante bien y se unen bien. El FR4 en solitario no dio resultado. La tabla a continuación muestra que el FR3 en solitario no aumentó la expresión.

Transfección transitoria en PER.C6					
Nombre de la Proteína	huFc-ELISA (ug/ml)	huFc-ELISA (ug/ml)	huFc-ELISA (ug/ml)	huFc-ELISA (ug/ml)	huFc-ELISA (ug/ml)
DI.17E6VL60.2CDR-425VLF3/VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)	0.79	2.72			
DI-17E6VL60.2CDR-425VLF3FR4/VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)	14.17	25.36	19.6		17
DI-17E8VL60.2CDR-425VLFrs/VH33 (C80Y)-g2h(FN->AQ)	20.78	31.76	24.3		28.5
DI-17E6VL60.2CDR-425VLF1FR2/VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)			4.5		6.2
DI.17E6VL60.2CDR-425VLF4/VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)				1.9	
DI-17E6VL60.2CDR-425VLF1/VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)				3	
DI-17E6VL60.2CDR-425VLFrs/17E6VHg2h(FN->AQ)	21.65	33.7	35.1	19	25.9
425VU17E6VH-g2h(FN->AQ)	35.14	53.66	47.3	40	51.9
17E6-g2h(FN->AQ)	3.74	8.86	9.8	4	8.7

Clones estables en NS0-LD en DMEM/F12 es matraces T25

Nombre de la proteína/# clon	rPA (ug/ml)
DI-17E6VL60.2CDR-425VLFrs/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)	
#423	38
#433	135
#434	62.5
#10	381
DI-17E6VL60.2CDR-425VLF3FR4/VH33(C60Y)g2h(FN->AQ)	
#1	29.5
#2	31.3

10

El DI-17E6-g2h(NtoQ)(C60Y) fue elegido como la molécula final debido al elevado nivel de expresión de los clones NS0-LD estables y debido a que mantiene la afinidad de unión.

Ejemplo 3

Para caracterizar la especificidad de la integrina del DI-17E6, se utilizaron análisis ELISA, ELISA celular y citometría de flujo, y estos permitieron identificar la cadena αv de integrinas como el ligando específico para EMD 525797.

- 5 EMD 525797 reconoce las integrinas αv purificadas pero, tal como se esperaba, no tenían reactividad contra $\alpha I I b \beta 3$ purificada. El EMD 525797 además interactúa con líneas celulares humanas con integrinas αv en su superficie celular, independientemente de la subunidad de la cadena- β asociada. La inmunoreactividad de EMD 525797 y de LM609 se encuentra representada en las siguientes tablas:

Reactividad inmunológica en integrinas purificadas

	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha I I b \beta 3$
EMD 525797	+	+	-
LM609	+	-	-

- 10 La reactividad de LM609 (anticuerpo monoclonal murino anti- $\alpha v \beta 3$) se muestra a modo comparativo. Reactividad inmunológica en las líneas celulares tumorales

	Célula de prueba	M21	M21-L	MeWo	HT29	Colo205	SKBR-3	A498	V+B2	CV-1
	Patrón de integrina αv	$\alpha v \beta 3$ $\alpha v \beta 5$	No integrinas αv	$\alpha v \beta 3$ $\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$ $\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$ $\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 1$	$\alpha v \beta 3$
EMD 525797		+	-	+	+	+	+	+	+	+
LM609		+		+	-	-	-	+	-	nd

- 15 La reactividad de LM609 (anticuerpo monoclonal murino anti- $\alpha v \beta 3$) se muestra a modo de comparación. Líneas celulares tumorales humanas: M21, M21-L, y melanomas MeWo; carcinomas de colon HT29 y Colo205; carcinoma de mama SKBR-3; carcinoma renal A498; y melanoma ocular V+B2. CV-1 es una línea celular de mono verde (*Chlorocebus sabaeus*).

El EMD 525797 reconoce únicamente las integrinas αv humanas y de mono, y no las de otras especies. La base molecular para este perfil inusual ha sido, de forma inequívoca, establecida por el mapeo de epítomos, comparación de secuencias, y co-cristalografía de rayos X. El epítipo reconocido por DI-17E6 se confirma único para humanos y monos por inmunoprecipitación y por análisis en Western blot realizado con varias especies.

20 **Ejemplo 4**

Inmunogenicidad

Los datos muestran que DI-17E6 es mucho menos inmunogénico que la versión de 17E6 murina original. La Figura 2 muestra que los niveles en suero de 17E6 murino proporcionados a un animal experimental disminuyen de forma considerable a lo largo de la duración del experimento.

- 25 Por otro lado, los niveles en suero de anticuerpos de mono con especificidad contra el 17E6 murino aumentó a lo largo de la duración del experimento y se correlaciona, de manera inversa, con los niveles en suero a la baja del 17E6 murino.

- 30 Esta correlación inversa sugiere que el 17E6 murino es altamente inmunogénico en monos y humanos, y por lo tanto mono o humanos desarrollan una respuesta MAMA o HAMA, respectivamente, lo que afecta de manera adversa la farmacocinética del 17E6 murino.

Otra finalidad del estudio era evaluar en mayor detalle la actividad anti-angiogénica de DI-17E6 en un experimento con plug se Matrigel en monos. A modo de comparación, el 17E6 murino se utilizó como un compuesto de referencia.

Se utilizaron cuatro grupos diferentes que contienen un único animal cada uno: vehículo, 17E6 murino a 30 mg/Kg, DI-17E6 a 30 mg/kg, y DI-17E6 a 10 mg/Kg. Los monos recibieron una inyección intravenosa (en el brazo) de 17E6 murino o DI-17E6 al comienzo del experimento que continuó durante 6 días. (Figura 2)

5 Los sueros se recogieron en tres puntos diferentes (de las piernas): inmediatamente antes de la inyección del anticuerpo, inmediatamente (1-2 minutos) después de la inyección del anticuerpo, y al final del estudio antes del sacrificio del animal. Los niveles tanto del 17E6 murino, como de DI-17E6 fueron analizados. Para detectar el suero proporcionado, se observaron diluciones en los dos puntos de tiempo diferentes en el suero: inmediatamente después de la administración del anticuerpo y al final del estudio. Esto se observó en ambos grupos tratados con DI-17E6: 10 y 30 mg/Kg.

10 Sin embargo, los niveles en suero de 17E6 murino, solo pudieron detectarse inmediatamente después de la inyección del anticuerpo. Eran casi nulos hacia el final del estudio. El experimento reveló una gran respuesta de neutralización (MAMA) del anticuerpo anti-murino de mono contra el 17E6, lo que apunta claramente a la alta inmunogenicidad del 17E6 murino en monos y otros primates tales como humanos. Esta respuesta condujo a la rápida y completa eliminación del 17E6 del suero de mono.

15 Por lo tanto, esto sugiere que el 17E6 murino se elimina más rápidamente en humanos, por una enorme respuesta HAMA.

20 En otro estudio, se evaluaron los parámetros de la farmacocinética de una dosis única de DI-17E6 en monos y además, este estudio se planeó para investigar la inmunogenicidad de DI-17E6. Se proporcionó DI-17E6 a 1 mg/Kg en una única inyección intravenosa al comienzo del experimento. La duración del ensayo fue de 6 semanas. Los sueros fueron extraídos previamente a la dosis, y 1, 3, y 6 semanas después de la administración. Los niveles de anticuerpos de mono contra DI-17E6 fueron analizados. En estudio, se abordó directamente la inmunogenicidad utilizando un método específico ELISA sándwich, designado para este tipo de estudios (método no validado aún).

25 La Figura 3 muestra que ningún anticuerpo de mono contra DI-17E6 pudo ser detectado en cualquier punto de tiempo del ensayo, indicando por lo tanto claramente que se generó una baja respuesta (MAHA) anti-humana de mono.

30 En experimentos adicionales, la inmunogenicidad de ambos anticuerpos se abordó directamente, mediante el estudio de los niveles en suero sostenidos de los dos anticuerpos 17E6 variantes, el 17E6 murino y el DI-17E6. El DI-17E6 presentó altos niveles en suero en cada punto de tiempo del ensayo, sugiriendo que el DI-17E6 no desencadenó ninguna respuesta del anticuerpo, y por tanto no era inmunogénico en monos. En contraste, el 17E6 murino no pudo ser detectado (niveles muy bajos o nulos) en suero hacia el último punto de tiempo. Esto indica que los monos presentaron una respuesta MAMA de eliminación contra el 17E6 murino debido a su inmunogenicidad.

35 Debido a que el 17E6 fue desimmunizado en base a la eliminación de los epítomos de reconocimiento de linfocitos T humanos, se espera que el DI-17E6 inmunogénico será bajo en humanos, permitiendo dosis terapéuticas repetidas sin la complicación de elevar la respuesta inmune que pudiera contrarrestar la eficacia terapéutica. Este es un resultado excepcional que debido al alto grado de homología entre el genoma humano y de mono, incluyendo la integrina alfa-v del antígeno 17E6, puede ser fácilmente extendido a la situación humana.

40 Esto fue, mientras tanto, confirmado por un primer estudio clínico llevado a cabo en los Estados Unidos en 2006/2007. El DI-17E6 se administró a 5 grupos de voluntarios sanos (cada grupo contiene 6 voluntarios) en diferentes dosis: 200 mg/Kg; 120 mg/Kg; 70mg/Kg, 35 mg/Kg correspondiente a 250 mg, 500 mg, 1000 mg y 1500 mg /dosis. Únicamente en el grupo de 250 mg un voluntario desarrolló anticuerpos anti-fármaco, mientras que en los grupos de mayores dosis (estas dosis se encuentran en un rango de administración terapéutica estándar) ningún voluntario desarrolló ninguna respuesta inmune contra DI-17E6. En contraste con eso, el 17E6 de ratón desarrolla en modelos animales una fuerte respuesta inmune.

45 De acuerdo al mapeo de epítomos de linfocitos T y método de eliminación utilizado en la presente patente, en donde la secuencia del anticuerpo de ratón es dividida en los péptidos que se solapan, la pérdida de la inmunogenicidad después de la inmunización fue confirmada por una disminución distintiva de la puntuación en un ensayo de linfocitos T in vitro, indicando que los epítomos de linfocitos T humanos potenciales habían sido eliminados. Por consiguiente, la puntuación disminuye de 147 (17E6 de ratón) a 92 (DI-17E6) en las cadenas livianas, y de 181 (17E6 de ratón) a 85 (DI-17E6) en las cadenas pesadas.

50

ES 2 395 799 T3

Cadena liviana de 12E6 de ratón

Posc	Secuencia	nUnión	Puntuación	Media
15	LGDRVIISC	4	100.6	25.04
19	VIISCRASQ	31	1177.12	37.97
20	IISCRASQD	1	22.34	22.34
21	ISCRASQDI	3	78.13	26.04
29	ISNYLSWYQ	7	169.20	24.17
33	LSWYQQKPD	1	20.93	20.93
44	VKLLIFYTS	12	303.43	25.29
46	LLIFYTSKL	24	940.44	39.18
47	LIFYTSKLH	15	497.37	33.16
48	IFYTSKLHS	34	1151.58	33.87
50	YTSKLHSGV	1	25.29	25.29
54	LHSGVPSRF	2	52.00	26.00
71	YSLTISNLD	3	76.60	25.53
83	IATYFCQQG	2	40.82	20.41
86	YFCQQGNTF	4	84.56	21.14
98	FGGGTKVEM	3	94.75	31.58
<u>Puntuación Total</u>			<u>147</u>	

Cadena liviana final de Del 17E6

Posc	Secuencia	nUnión	Puntuación	Media
2	*IQMTQSPSS	22	615.49	27.98
15	*VGDRVITIC	5	139.09	27.82
19	*VTITCRASQ	17	421.29	24.78
21	ITCRASQDI	3	86.42	28.81
29	*ISNYLAWYQ	4	98.65	24.66
46	LLIYYTSKI	33	1195.64	36.23
47	LIYYTSKIH	15	497.37	33.16
48	IYYTSKIHS	30	906.02	30.20
49	YYTSKIHSG	1	20.00	20.00
50	YTSKIHSGV	1	25.29	25.29
54	IHSGVPSRF	2	52.00	26.00
71	YTFTISSLQ	4	115.43	28.86
73	*FTISSLQPE	3	71.05	23.68
83	IATYYCQQG	2	40.82	20.41
86	YYCQQGNTF	4	88.56	22.14
94	*FPYTFGQGT	2	44.83	22.41
98	*FGQGTKVEI	5	135.81	27.16
<u>Puntuación Total</u>			<u>92</u>	

ES 2 395 799 T3

Cadena pesada de 17E6 de ratón

Posc	Secuencia	nUnió	n	Puntuación	Media
2	VQLQQSGAE		5	129.45	25.89
4	LQQSGAELA		6	140.28	23.38
18	VKMSCKASG		27	881.03	32.63
27	YTFSSFWMH		2	46.55	23.28
29	FSSFWMHWV		3	80.61	26.87
32	FWMHWVKQR		18	546.68	30.37
33	WMHWVKQRP		2	59.09	29.55
36	WVKQRPGQG		9	229.70	25.52
37	WIGYINPRS		4	90.82	22.70
47	VKQRPGQGL		9	282.09	31.34
48	IGYINPRSG		10	280.39	28.04
51	INPRSGYTE		3	81.56	27.19
63	IFRDKATMT		7	197.95	28.28
64	FRDKATMTA		19	609.26	32.07
80	YMQLSGLTS		22	678.41	30.84
81	MQLSGLTSE		5	116.59	23.32
83	LSGLTSEDS		3	63.39	21.13
93	VYYCASFLG		11	297.27	27.02
94	YYCASFLGR		2	51.02	25.51
99	FLGRGAMDY		11	321.71	29.25
107	YWGQGTSVT		1	23.40	23.40
108	WGQGTSVTV		2	62.07	31.03
<u>Puntuación Total</u>			<u>181</u>		

Cadena pesada final de Del 17E6

Posc	Secuencia	nUnión	Puntuación	Media
2	VQLQQSGGE	5	129.45	25.89
18	*VKVSCASG	12	366.95	30.58
27	YTFSSFWMH	2	46.55	23.28
29	FSSFWMHWV	3	80.61	26.87
32	FWMHWVRQA	14	673.39	48.10
33	*WMHWVRQAP	2	52.27	26.14
36	*WVRQAPGQG	17	473.32	27.84
37	*VRQAPGQGL	8	276.30	34.54
47	WIGYINPRS	9	282.09	31.34
48	IGYINPRSG	10	280.39	28.04
51	INPRSGYTE	3	81.56	27.19
63	IFRDKATMT	7	197.95	28.28

Cadena pesada final de Del 17E6

Posc	Secuencia	nUnión	Puntuación	Media
------	-----------	--------	------------	-------

64	FRDKATMTT	10	304.58	30.46
80	*YMELSSLRS	16	481.10	30.07
81	*MELSSLRSE	1	35.56	35.56
86	*LRSEDNAVY	12	357.27	29.77
93	VYYCASFLG	11	297.27	27.02
94	YYCASFLGR	2	51.02	25.51
99	FLGRGAMDY	11	321.71	29.25
107	YWGQGTSVT	1	23.40	23.40
108	WGQGTSVTV	2	62.07	31.03

Puntuación Total 85

Ejemplo 5

5 Aunque el DI-17E6 no reacciona de forma cruzada con el receptor del fibrinógeno de las plaquetas α IIb β 3, las plaquetas también expresan algunas integrinas α v. Para excluir los posibles efectos secundarios del anticuerpo en las plaquetas, el EMD 525797 fue evaluado para la inhibición de la aglutinación de las plaquetas *in vitro* con plasma/colágeno rico en plaquetas humanas. No se detectó ninguna actividad anti-aglutinamiento ni en 160 nM ni 1600 nM. Los estudios de aglutinación y activación se llevaron a cabo utilizando Plasma rico en Plaquetas (PRP).

Formación de trombos por cámara de perfusión con matriz sub-endotelial expuesta.

El resultado experimental puede ser resumido tal como sigue a continuación:

10 El DI-17E6 no induce ninguna activación de las plaquetas ni aglutinación de plaquetas en ninguna concentración (desde muy baja hasta muy alta: 0.1 a 1000 μ g/ml).

De manera sorprendente, el DI-17E6 bloquea la aglutinación de plaquetas inducida por un inductor débil como ADP, en una manera dependiente de la dosis. El DI-17E6 no afecta a la aglutinación de plaquetas inducida por un inductor de la aglutinación como el colágeno. El DI-17E6 afecta, además, (bloquea) la formación de trombos plaquetarios en la cámara de perfusión, de manera dependiente de la dosis y revela una actividad antitrombótica.

15 La interferencia débil con la aglutinación de plaquetas es un resultado inesperado para el DI-17E6 como un potencial que puede volverse terapéuticamente útil, ya que las zonas cercanas a un tumor se caracterizan por muchos sitios vasculares trombogénicos.

Ejemplo 6

Actividad anti-angiogénica *in vivo* en modelos tumorales con xenoinjerto de ratón

20 Piel humana que contiene células de melanoma M21 humano se injertó mediante implantación/ trasplante en ratones desnudos o SCID. Los tumores experimentales crecieron en este tejido, después de que la inoculación intradérmica de células tumorales y la vasculatura angiogénica inicial se derivara de los vasos en la piel humana. En el siguiente experimento, el uso de células M21-L que no presentan integrinas α v significa que sólo se seleccionaron con diana aquellas integrinas expresadas en las células endoteliales dentro de la piel humana injertada.

25 El DI-17E6 inhibió el crecimiento de los tumores de M21-L en el modelo quimérico de piel humana-ratón SCID, y se activó a una dosis de 1 mg/dosis administrada por vía intra peritoneal 3 veces por semana, comenzando el tratamiento un día después de la inoculación de las células tumorales (Figura 4). Este resultado demuestra que el EMD 525797 suscita un efecto anti-angiogénico en el crecimiento tumoral.

30 Ejemplo 7

La inhibición de la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento en el modelo con plug de Matrigel en monos mediante inyección de EMD 525797 por vía intravenosa.

Para ampliar la evaluación de la actividad anti-angiogénica del EMD 525797, el mismo fue sometido a prueba en un modelo libre de tumores en monos, donde la angiogénesis es inducida por el factor angiogénico bFGF.

5 Se implantaron plugs de Matrigel que contenían el bFGF por vía subcutánea (s.c.) en el abdomen de monos Cynomolgus sanos. Los animales fueron inyectados una vez con EMD 525797 por vía intravenosa a razón de 10 mg/Kg o 30 mg/Kg. La evaluación de la angiogénesis se llevó a cabo 6 días después mediante cuantificación del contenido de hemoglobina en los plugs de Matrigel. EL tratamiento de monos con EMD 525797 bloqueó la formación de nuevos vasos sanguíneos de manera dependiente de la dosis, resultando altamente eficaz a razón de 30 mg/Kg, pero inactivo a 10 mg/Kg (Figura 5).

Ejemplo 8

Los ensayos in vitro de DI17E6 en combinación con agentes quimioterápicos en células HUVE

10 En el estudio actual, se investigaron agentes quimioterápicos representativos de diferentes clases de inhibidores en combinación con el inhibidor de la integrina alfa v cilengitide y el DI-17E6. El diseño experimental da respuesta a la pregunta de si el bloqueo del uno bajó el IC50 del otro para el bloqueo del crecimiento de células endoteliales en presencia de los factores de crecimiento tumoral VEGFA y FGF2. Las pruebas se llevaron a cabo con células HUVEC y células endoteliales microvasculares, que fueron complementadas con VEGFA y FGF2, lo que estimuló el crecimiento de dichas células en u factor de hasta un 500%.

15 Se recubrieron placas con 100 µl de VN a razón de 1 µg/ml en PBS por placa de 96 pocillos a 4°C durante la noche. Las células se colocaron en placas a razón de 5x10e3 células/pocillo en 100 µl de Medio 199 que contiene 2% de FCS. Después de 60 minutos a 37°C, se añadieron bloqueantes de la integrina alfa V y agentes quimioterápicos, solos o en combinación a razón de dos veces la concentración en 100 µl/pocillo en Medio 199 más 2% de FCS y 20 ng/ml de FGF-2, para las células HUVE, o con 20 ng/ml de VEGF para las células HDMVEC (la concentración final de los factores de crecimiento fue de 10 ng/ml). Cuando se añadieron en combinación, las dos sustancias de prueba se mezclaron a las concentraciones iniciales y la mezcla se diluyó en serie, tal como se hizo para los agentes individuales en solitario. En algunos ensayos los quimioterápicos se diluyeron en serie en presencia de una cantidad constante de bloqueantes de alfa V en las concentraciones del IC₅₀ o IC₇₀. Se incubaron las placas durante 72 horas, a continuación la cantidad relativa de células fue determinada por la adición de 20µl/pocillo de azul Alamar (Resazurina). Después de 4 horas de incubación a 37°C la fluorescencia se leyó en un lector de placas Genios (SLT) a 535/590 nm (excitación/ emisión).

Los puntos fueron ejecutados por duplicado y por triplicado. Los blancos reactivos, que contienen medios más azul Alamar sin células, se sometieron a ensayo en cada placa. Los valores del blanco fueron sustraídos de los valores de los ensayos y fueron, de forma rutinaria, un 5-10 % de valores de control no inhibidos.

30 El Cilengitide se sometió a prueba en el rango de 50 µM a 0.1 nM. Los anticuerpos 17E6 y DI-17E6 se sometieron a prueba a razón de 50 µg/ml a 0.1 ng/ml. Las concentraciones iniciales de agentes quimioterápicos que han sido sometidas a prueba, se encuentran en la tabla a continuación:

Agente quimioterápico	Mecanismo de acción	Concentración inicial
Taxol	Taxano/microtúbulos	50 ng/ml
Etopósido	Inhibidor de Topoisomerasa II	100 uM
Vincristina	Alcaloide de la Vinca/microtúbulos	10 nM
Cis-platino	Análogo del Platino	200 uM
Camptotecina	Inhibidor de Topoisomerasa I	10 uM
Doxorubicina	antraciclina	1 uM
Melfalán	Agente alquilante	100 uM
Temozolomida	Agente alquilante	50 uM

(continuación)

Agente quimioterápico	Mecanismo de acción	Concentración inicial
Estramustina	Agente alquilante	100 uM
5-FU	antimetabolito	100 uM
Gemcitabina	antimetabolito	nM

5 La sustancia bloqueante de la integrina alfa V, Cilengitide (EMD 121974), y dos anticuerpos bloqueantes de la
función de la integrina alfa V, 17E6 (EMD 73034) y su forma desimmunizada DI-17E6 (EMD 525979), se sometieron
a prueba en solitario y en combinación con agentes quimioterápicos habituales, en un ensayo de crecimiento por
estimulación del FGF, utilizando células endoteliales humanas (HUVEC) o en un ensayo de estimulación de VEGF
utilizando células endoteliales microvasculares dérmicas humanas. En este sistema de ensayo las células se cultivan
en un medio de suero reducido (2% de FCS en Medio 199) con FGF-2 o VEGF como único estímulo de crecimiento.
10 Los factores de crecimiento FGF2 resultaron ser los mejores estimulantes del crecimiento para HUVEC, y VEGF fue
el mejor estimulante para HDMVEC medido utilizando el ensayo con azul Alamar. Las HUVEC que recibieron 12.5
ng/ml de FGF-2 mostraron un aumento de un 406% y con VEGF de un 238%, sobre las células de control que
recibieron ningún factor de crecimiento añadido después de 72 horas de crecimiento en VN. En contraste, las
HDMVEC fueron estimuladas de manera preferente por VEGF que por FGF-2, (484%). Las pruebas se ejecutaron
de manera rutinaria utilizando HUVEC en medios que contienen 10 ng/ml FGF-2, o HDMVEC en medios que
15 contienen 10 ng/ml de VEGF. Los bloqueantes de la integrina alfa V y Paclitaxel inhibió el crecimiento celular cuando
se añadieron como elementos individuales. En un ensayo típico utilizando HUVEC, el IC₅₀ para el Cilengitide fue de
700 nM, para 17E6 fue de 5 ng/ml, y para el DI-17E6 de 4 ng/ml. Para el Paclitaxel el IC₅₀ fue de 0.27 ng/ml cuando
se añadió en solitario, pero el IC₅₀ se redujo a 0.13 ng/ml cuando se utilizó en combinación con Cilengitide. Los
anticuerpos 17E6 y DI-17E6 causaron una reducción en el IC₅₀ de Paclitaxel a 0.18 ng/ml y 0.1 mg/ml,
20 respectivamente. Un resultado típico para DI17E6 cuando se utilizó en combinación con Paclitaxel se muestra en la
Figura 6.

El efecto acumulativo de Paclitaxel con los bloqueantes de la integrina alfa V, se obtuvo también con HDMVEC. La
lista completa de agentes quimioterápicos sometidos a prueba se muestra en la siguiente Tabla.

Quimioterápico	Cilengitide	Mab 17E6	DI-17E6	IC50
Taxol	sí	sí	sí	0.3 ng/ml
Etopósido	sí	sí	sí	0.7 uM
5FU	sí	sí	sí	14.5 uM
Cisplatino	sí	sí	sí	13.2 uM
Melfalán	sí	sí	sí	11.4 uM
Doxorubicina	sí	sí	sí	0.2 uM
Camptotecina	sí	sí	sí	0.08 uM
Vincristina	sí	sí	sí	0.7 nM
Gemcitabina	sí	sí	sí	4 nM
Estramustina	no	no	no	182 uM
Temozolomida	no	no	no	inactivo
121974				296 nM
Mab 17E6				5 ng/ml
DI-17E6				4 ng/ml

5 Los resultados muestran que en HUVEC DI-17E6 causa un efecto acumulativo marcado cuando se combina con un segundo agente terapéutico como el Paclitaxel, mientras que otros quimioterápicos muestran, cuando se combinan con un anticuerpo modificado genéticamente de acuerdo a la invención, ningún efecto o tan sólo un efecto ligeramente acumulativo.

Ejemplo 9

Ensayo In vitro de DI17E6 en combinación con los agentes quimioterápicos en diferentes células de melanoma humano.

10 En un ensayo de proliferación in vitro se investigó el efecto de una diversidad de quimioterápicos, bien conocidos y aplicados en la terapia de tumores, cuando se combinaban con DI-17E6 en diferentes líneas celulares de melanoma humano: m21, SKMEL-23, SKMEI; MeWo, WM-793.

Los resultados muestran que existen tan sólo ligeras diferencias con respecto al agente quimioterápico utilizado (en este caso: cisplatino, paclitaxel, vinblastina, vincristina y temozolomida).

15 Las diferencias son reconocibles con respecto a la línea celular tumoral utilizada. En todos los casos, el DI-17E6 no causa más que efectos aditivos del agente quimioterápico.

20 En resumen: se observó ningún efecto o únicamente un efecto ligeramente acumulativo con la combinación de DI-17E6 más el agente quimioterápico para tales líneas celulares tumorales, que son insensibles a DI-17E6. Un efecto acumulativo intenso pudo detectarse con la combinación de DI-17E6 más el agente quimioterápico para tales líneas celulares tumorales, que son insensibles al DI-17E6. En estos casos el perfil de proliferación corresponde al representado para paclitaxel + DI-17E6 en HUVEC (ver la Figura 6).

Ejemplo 10

Combinación sinérgica de DI-17E6 y cilengitide in vitro

5 Se han logrado resultados inesperados cuando se han sometido a prueba las combinaciones de DI-17E6 y cilengitide in vitro. Las líneas celulares NSCLC H322, A549, H1975 y H460, la línea celular M21 del melanoma en humanos, y las líneas celulares de carcinoma renal ACHN, A498, Caki 1 y Caki 2, se trataron con cilengitide en presencia de DI-17E6. Los resultados mostraron considerablemente más muerte celular después de 3 días cultivados en medio normal, que en presencia de cilengitide o DI-17E6 solo.

Un experimento típico establecido para probar el efecto sinérgico de DI-17E6 y el cilengitide, se realizó como un ensayo de proliferación con células M21, CAKI-2 and A498:

10 Se recubrieron placas de 96 pocillos con vitronectina, y después de ser bloqueadas, se han añadido células (3000-5000 células/pocillo), y después de 4 horas (tiempo suficiente para permitir el acoplamiento y la propagación celular) se añadieron fármacos y se cultivaron en presencia de Cilengitide diluido en serie, en solitario o junto con DI-17E6 a razón de 1 µg/ml. Se incubaron células durante tres días más, y la viabilidad celular se midió siguiendo las instrucciones del proveedor del reactivo azul Alamar.

15 La Figura 7 proporciona la tasa de muerte celular para dicha combinación en células M21 (curva superior: cilengitide solo, curva inferior cilengitide + DI-17E6).

La Figura 8 proporciona la tasa de muerte celular para dicha combinación en células CAKI-2 (curva superior: cilengitide solo, curva inferior cilengitide + DI-17E6).

La Figura 9 proporciona la tasa de muerte celular para dicha combinación en células A498 (curva superior: cilengitide solo, curva inferior cilengitide + DI-17E6).

20 Este es un resultado inusual con ambos aglutinantes de integrinas alfa v, lo que prevé la saturación previa del sistema con un inhibidor alostérico, antes de las adiciones de impulsos de los inhibidores competitivos en presencia continua del inhibidor alostérico. Esto proporciona un bloqueo sinérgico de la integrina, amplificando ampliamente el efecto del inhibidor competitivo solo, o el inhibidor estérico/ alostérico solo. De manera importante, la continua presencia de los inhibidores competitivos no suele ser necesaria, su papel es liberar la interacción principal, permitiendo el acceso del inhibidor alostérico.

25

Ejemplo 11

Ensayos in vivo de DI-17E6 en combinación con el agente quimioterápico Gemcitabina más DI-17E6 en células pancreáticas humanas NP 18-b3.

30 El crecimiento de un tumor pancreático injertado de manera ortotópica en ratones desnudos se sometió a estudio bajo co-tratamiento con EMD 525797 más gemcitabina. La gemcitabina se seleccionó para el tratamiento combinado de un modelo tumoral pancreático humano injertado de manera ortotópica porque éste es el agente quimioterápico mejor acreditado para para esta indicación.

35 La línea celular humana pancreática NP 18-b3, que expresa la integrina $\alpha\beta3$, se implantó de manera ortotópica en el páncreas de ratones inmunodeprimidos. Los animales fueron seleccionados de manera aleatoria, y una semana más tarde comenzó el tratamiento con fármacos y un vehículo.

40 Los tumores fueron extraídos y cortados en trozos de 10 mg cada uno. Estos trozos fueron suturados, entonces, al páncreas de animales sanos (un trozo por animal). 4-6 semanas más tarde, los tumores fueron extraídos, cortados en trozos nuevamente y se cosieron en nuevos animales. Esos nuevos animales se seleccionaron de manera aleatoria y una semana más tarde comenzó el tratamiento con fármacos y un vehículo. Se dosificó EMD 525797 por vía intraperitoneal a razón de 500 µg por animal tres veces por semana. Se administró gemcitabina como una dosis subóptima de 50 mg/Kg 3 veces por semana (dosis subóptima en base a estudios previos). En un cuarto grupo, el EMD 525797 se combinó con dosis subóptimas de gemcitabina en base a experimentos previos. La medición del crecimiento tumoral (peso de los tumores extraídos) fue realizada 6 semanas después del injerto del tumor.

45 Los tumores ortotópicos tratados con EMD 525797 tenían un tamaño y peso similares que los animales tratados con un vehículo de control. De manera similar, la gemcitabina, a la dosis subóptima resultó también no activa. Sin embargo, a la misma dosificación que los regímenes monoterapéuticos, la gemcitabina más el EMD 525797 presentaron una actividad sinérgica con una reducción tumoral del 52% (Figura 10).

Cisplatino/dacarbacina más DI-17E6 en modelos con injerto de melanoma M21 o MeWO humano

Células de melanoma humano M21 o MeWo positivas para expresar la integrina $\alpha\beta 3$ fueron inoculadas por vía subcutánea en ratones desnudos o SCID de acuerdo a protocolos estándar bien conocidos.

Se administró DI-17E6 de manera sistémica en conjunto con cis-platino (cPT) o con Dacarbacina (DTIC), dos quioterápicos utilizados en el tratamiento del melanoma.

5 Se administró DI-17E6 por vía intraperitoneal una vez por semana desde el mismo día de la inyección subcutánea de células M21 o MeWo en los animales a razón de una dosis de mantenimiento semanal subóptima de 27.2 mg/Kg (corresponde a alrededor de 500 $\mu\text{l/ml}$ en suero). El DTIC fue administrado por vía intraperitoneal una vez por semana a razón de 50 mg/Kg,

10 y el cPT fue administrado por vía intraperitoneal una vez por semana a razón de 10 mg/Kg, comenzando cada administración 11 días después de la inyección de células.

Los resultados obtenidos con el cisplatino en el modelo de injerto de M21 se muestra en la [Figura 11](#).

En contraste con los datos in vitro mostrados anteriormente, la combinación de cisplatino más DI-17E6 in vivo suscita, claramente, un aumento sinérgico estadísticamente significativo en respuesta, en comparación con la administración del tratamiento con cualquiera de los fármacos en solitario.

15 Los resultados obtenidos con DTIC en el modelo de xenoinjerto de MeWo se muestra en la [Figura 12](#).

En contraste con los datos in vitro mostrados anteriormente, la combinación de cisplatino más DI-17E6 in vivo suscita, claramente, un aumento sinérgico estadísticamente significativo en respuesta, en comparación con la administración del tratamiento con cualquiera de los fármacos en solitario.

Ejemplo 12

20 Ensayo in vivo de DI-17E6 en el modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma renal CAKI-1 humano

Se inoculó CAKI-1 por vía subcutánea en ratones desnudos o SCID de acuerdo a protocolos estándar bien conocidos.

Se administró DI-17E6 de manera sistémica por vía intraperitoneal una vez por semana desde el mismo día de la inyección subcutánea de células M21 o MeWo en los animales en diferentes dosis.

25 La [Figura 13](#) muestra que, de manera sorprendente, el DI-17E6 puede reducir el tamaño/volumen del tumor desde dosis bajas (1 $\mu\text{g/ml}$) a medias (100 $\mu\text{g/ml}$ en suero) hasta aproximadamente el mismo grado (sin efecto real de la dosis), mientras que la administración de una dosis alta (500 $\mu\text{g/ml}$) conduce a una reducción completa del volumen tumoral.

Ejemplo 13

30 Efecto combinatorio del DI-17E6 con cetuximab (Erbix®) en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales humanas CAKI-1.

35 La línea celular del carcinoma renal CAKI-1 se cultivó en RPMI que contiene 10% de FCS (inactivada por calor) más 2 mM de glutamina. 1 mM de piruvato de sodio. 100 unidades/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina. Las células se pasaron en confluencia lavándolas una vez en PBS libre de cationes, seguido de una incubación de 3 minutos en solución de tripsina (0.5 $\mu\text{g/ml}$)/EDTA (0.2 $\mu\text{g/ml}$) en PBS a 37°C. Las células fueron recuperadas en el medio, centrifugadas y recogidas en el medio y contadas.

Los animales utilizados en este estudio fueron suministrados por HARLAN INTERFAUNA IBERICA S.L. (Sant Feliu de Codines (Barcelona) España), y fueron alojados durante el periodo de aclimatación de un mínimo de 5 días en las áreas de cuarentena en instalaciones libres de patógenos.

40 Durante el periodo de aclimatación todas las observaciones fueron registradas. Todos los animales fueron inspeccionados por un veterinario para asegurar la salud de los animales.

El tratamiento comenzó para todos los grupos en el día 0 del experimento (mismo día de la inyección de las células).

Los animales fueron tratados por vía intraperitoneal (i.p.) con un producto o vehículo a razón de un volumen de 10 mg/ml una vez por semana para EMD 525797 y dos veces por semana para Erbitux.

Las dosis de tratamiento para EMD 525797 se ajustaron a los valores mínimos esperados de 100 µg/ml. Para lograr estos valores mínimos en suero, se dosificaron los animales siguiendo una dosis de carga única de 17.1 mg/Kg más una programación de múltiples (semanalmente) dosis de mantenimiento de 5.1 mg/Kg, tal como se describe en la siguiente tabla.

- 5 Todos los animales fueron observados a diario, controlando sus condiciones físicas, comportamiento, presencia de heridas, y cualquier signo clínico.

Grupo	Sustancia administrada	Valor mínimo en suero (µg/ml)	Grupos		Cantidad de Animales
			Dosis de carga Única DI17E6 (mg/Kg)	Dosis de Mantenimiento Semanal (mg/Kg)	
A	Vehículo (PBS)	0	0	0	10
B	DI17E6	100	17.1	5.1 (semanalmente)	10
C	Erbitux	-	12	12 (bisemanal)	10
D	Erbitux	-	4	4 (bisemanal)	10
E	DI17E6 + Erbitux	100	17.1/12	5.1 (semanalmente) 12 (bisemanal)	10
F	DI17E6 + Erbitux	100	17.1/4	5.1 (semanalmente) 4 (bisemanal)	10

- 10 Los animales con tumores de xenoinjerto de CAKI-1 renales humanos fueron tratados con DI17E6, Erbitux o la combinación de ambos comenzando en el día 0, cuando las células tumorales fueron inoculadas. La duración del tratamiento para DI17E6 fue de 40 días y para el Erbitux y los grupos de combinación de 29 días. Se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral hasta 111 días después de la inoculación del tumor. El tratamiento con una dosis inicial de 17.1 mg/Kg seguido de un tratamiento semanal con 5.1 mg/Kg de DI17E6 dio como resultado valores mínimos de 100 µg/ml causando una inhibición del crecimiento tumoral significativa en el día 40, el final del tratamiento (T/C: 25%).

- 15 Después del día 40 un retraso en el crecimiento pudo observarse aún, hasta el final del periodo de observación. El tratamiento dos veces por semana con 4 mg/Kg o bien 12 mg/Kg de Erbitux causó un efecto anti-tumoral significativo y fuerte. T/Cs en el día 29, el final del tratamiento, fueron de un 9%. Un fuerte efecto anti-tumoral similar se observó para ambas combinaciones, DI17E6 más 4 mg/Kg de Erbitux 2/s y DI17E6 más 12 mg/Kg 2/s. T/Cs en el día 29, el final del tratamiento, fueron del 10% y 9% (ver tabla 1) respectivamente.

- 20 Debe señalarse que 10 µg/ml en suero / plasma corresponde a 0.55 mg / Kg de peso corporal.

Sin embargo, los tumores en los grupos de tratamiento con Erbitux en solitario, comenzaron a crecer nuevamente después de detener el tratamiento. En contraste, en ambos grupos de combinación la inhibición del crecimiento tumoral continuó siendo evidente a partir de la media de disminución y la media de los tamaños de los tumores. (Figura 14).

- 25 Al final del periodo de observación en ambos grupos de combinación, sólo uno de los tumores había alcanzado el volumen del día 7, que representa el día de la primera medición del tamaño del tumor.

En los grupos de monoterapia con Erbitux, 3 tumores crecieron hasta tamaños considerables (> 1000 mm³), y la mayoría de ellos crecieron hasta tamaños por encima del tamaño del tumor en el día 7.

- 30 En general, todos los tratamientos fueron bien tolerados, como indicó la ganancia de peso durante el experimento. La reducción de peso en el grupo de vehículo y en el grupo tratado con DI17E6 en un único día de medición fue muy probablemente causada por una carencia de suministro de agua. En ambos grupos relevantes la reducción de peso fue reversible seguida de una ganancia de peso en desarrollo.

- 35 El tratamiento con una dosis inicial de 17.1 mg/Kg seguido por una dosis semanal de 5.1 mg/Kg de DI17E6 que condujo a valores mínimos de 100 µg/ml durante el tratamiento causó una inhibición significativa de los tumores de CAKI-1 renales humanos. Además, el tratamiento único con dos dosis diferentes de Erbitux utilizando una

programación semanal causó una inhibición del crecimiento tumoral significativa. Ambas dosis de Erbitux fueron aproximadamente igual de potentes en su actividad anti-tumoral. La combinación de DI17E6 con 4 mg/Kg de Erbitux o 12 mg/Kg de Erbitux causó también un efecto anti-tumoral potente, que es comparable a los tratamientos con Erbitux únicos durante el periodo de tratamiento.

- 5 Sin embargo, la notable diferencia entre las monoterapias con Erbitux y los tratamientos de combinación, es el comportamiento del crecimiento después de que el tratamiento se detenga en el día 29. Hasta 82 días después de la detención del tratamiento tan solo uno de los tumores en el grupo de combinación creció hasta el tamaño del día 7, el primer día de las mediciones del tamaño tumoral, lo que significa que los tumores tratados con DI17E6 y Erbitux o bien sufrieron una regresión o mostraron enfermedad estable.
- 10 En contraste, en los dos grupos tratados con Erbitux únicamente, algunos tumores crecieron después de la detención del tratamiento hasta tamaños considerables (variando desde 429 hasta 3581 mm³), indicando que la combinación de DI17E6 y Erbitux pudo evitar la recaída del crecimiento tumoral después del tratamiento con Erbitux.

15 El efecto sinérgico fuerte del DI-17E6 en el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa, tales como el cetuximab (Erbitux®) puede denominarse como extraordinario y abre el campo para una terapia tumoral de combinación prometedor.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo híbrido anti- integrina α v recombinante modificado genéticamente, que comprende

(i) las regiones CDR de la cadena liviana:

CDR1 : RASQDISNYLA

5 CDR2: YTSKIHS

CDR3: QQGNTFPYT

(ii) las regiones CDR de la cadena pesada:

CDR1: SFWMH,

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD,

10 CDR3: FLGRGAMDY;

(iii) las regiones armazón de la cadena liviana:

FR-1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC,

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYYC

15 FR-4: FGQGTKVEIK

(iv) las regiones armazón de la cadena pesada

FR1: QVQLQQSGAELAEPGASVKMSCKASGYTFS

FR2: WVKQRPGQGLEWIG

FR3: KATMTADTSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAS

20 FR4: WGQGTSTVTVSS

y

(v) una región constante de la cadena pesada que se deriva de la IgG humana y una región de la cadena liviana constante humana.

25 2. Un anticuerpo modificado genéticamente de la reivindicación 1, en donde la región constante de la cadena pesada se deriva de la IgG2.

3. Un anticuerpo modificado genéticamente de la reivindicación 2, en donde dicha región constante de la IgG2 comprende una región bisagra de la IgG1 modificada.

4. Un anticuerpo modificado genéticamente de la reivindicación 3, en donde dicha región bisagra modificada de la IgG1 comprende la secuencia EPKSSDKTHTCPPCP.

30 5. Un anticuerpo modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha región constante de la IgG2 es modificada mediante la sustitución del aminoácido N con Q en la posición 297.

6. Un anticuerpo modificado genéticamente de la reivindicación 5, en donde el residuo de aminoácido F en la posición 296 es sustituido por A, a fin de eliminar un epítipo de linfocito T generado por la modificación en la posición 297.

7. Un anticuerpo modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la región constante de la cadena liviana es kappa humana.

8. Un anticuerpo híbrido anti- integrina α v recombinante de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que consiste en

5 (i) secuencias de la cadena liviana constantes y variables:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSKIH
GVPSRFRSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDYATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

y

(ii) secuencias de la cadena pesada constantes y variables:

**QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHWRQAPGQGLEWIGYINP
RSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFLGRGAMDY
WGQGT'TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
EPKSSDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLT'V'VHQQDWLNGKEYKCKV
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV'F'SCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK.**

10 9. Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 fusionada en su C-terminal a una citocina o factor de crecimiento.

10. Una molécula de ADN que codifica un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo, tal y como se ha especificado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un vector de expresión que comprende una molécula de ADN de la reivindicación 10.

15 12. Un sistema de expresión de proteínas que comprende una célula hospedadora mamífera transformada con el vector de expresión de la reivindicación 11, en donde una célula hospedadora humana es excluida.

13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo, tal como se ha especificado en las reivindicaciones 1 a 9 en una cantidad farmacéuticamente efectiva, de manera opcional en conjunto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 14. Una composición farmacéutica que comprende un primer y un segundo agente farmacéuticamente efectivo, en donde el primer agente es un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo, tal como se ha especificado en las reivindicaciones 1 a 9, y el segundo agente se seleccionó del grupo que consiste en: un agente terapéutico, un inhibidor de la angiogénesis y un agente anti-tumoral, de manera opcional en conjunto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Una composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde el agente antitumoral es un anticuerpo anti-tumoral.
16. Una composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo anti-tumoral es un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti- Her2.
- 5 17. Una composición farmacéutica de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo anti-tumoral es el anticuerpo anti-EGFR cetuximab o matuzumab.
18. Una composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde el inhibidor de la angiogénesis es el inhibidor de la integrina cilengitide.
- 10 19. Una composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde el agente quimioterápico es cisplatino, DTIC o darcabacina.
20. Un anticuerpo o una proteína de fusión de anticuerpo modificado genéticamente, tal como se ha especificado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de tumores sólidos o metástasis tumorales.
- 15 21. Un anticuerpo modificado genéticamente de la reivindicación 20 para su uso de acuerdo a la reivindicación 20, en donde el efecto en el crecimiento tumoral es independiente del efecto anti-tumoral indirecto de dicho anticuerpo causado por su efecto bloqueante de la angiogénesis.
22. Una composición farmacéutica, tal como se ha especificado en las reivindicaciones 13 a 19, para su uso en el tratamiento de tumores.
- 20 23. Una composición farmacéutica, tal como se ha especificado en la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de tumores, en donde el anticuerpo anti-tumoral es un anticuerpo anti-EGFR, y dicho anticuerpo recombinante modificado genéticamente evita o retrasa un nuevo crecimiento del tumor después de la detención de la administración del anticuerpo modificado genéticamente.
24. Una composición farmacéutica de la reivindicación 23 para su uso de acuerdo a la reivindicación 23, en donde el primer agente terapéutico es el anticuerpo modificado genéticamente de la reivindicación 8 y el segundo agente terapéutico es cetuximab.

25

Figura 1A

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
 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGGCAAGT
 Q D I S N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S
 CAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTACACATCA
 K I H S G V P S R F S G S G S G T D Y T F T I S S L
 AAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTC
 Q P E D I A T Y Y C Q Q G N T F P Y T F G Q G T K V
 CAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTG
 E I K (SEQ ID No. 1)
 GAAATCAAA

Figura 1B

Q V Q L Q Q S G G E L A K P G A S V K V S C K A S G
 CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGC
 Y T F S S F W M H W V R Q A P G Q G L E W I G Y I N
 TACACCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAT
 P R S G Y T E Y N E I F R D K A T M T T D T S T S T
 CCTAGATCTGGTTATACTGAGTgTAATGAGATATTCAGGGACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACA
 A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A S F L G R G A
 GCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCT
 M D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID No. 2)
 ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCA

Figura 1C

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDISNYLAWYQOKPGKAPKLLIYYT**SKIHSGVPS**
RFSGSGSGTDYTFITISLQ**PEDIATYYCQOGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP**
 SDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID No. 3)

Figura 1D

QVQLQOSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHWRQAPGQGLEWIGYINP
RSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSED**TAVYYCASFLGRGAMDY**
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNV**DHKPSNTKVDKTV**
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ**AAQ**STFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKV
 NKGLPAPIEKTKISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALH
 NHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID No. 4)

Figura 2

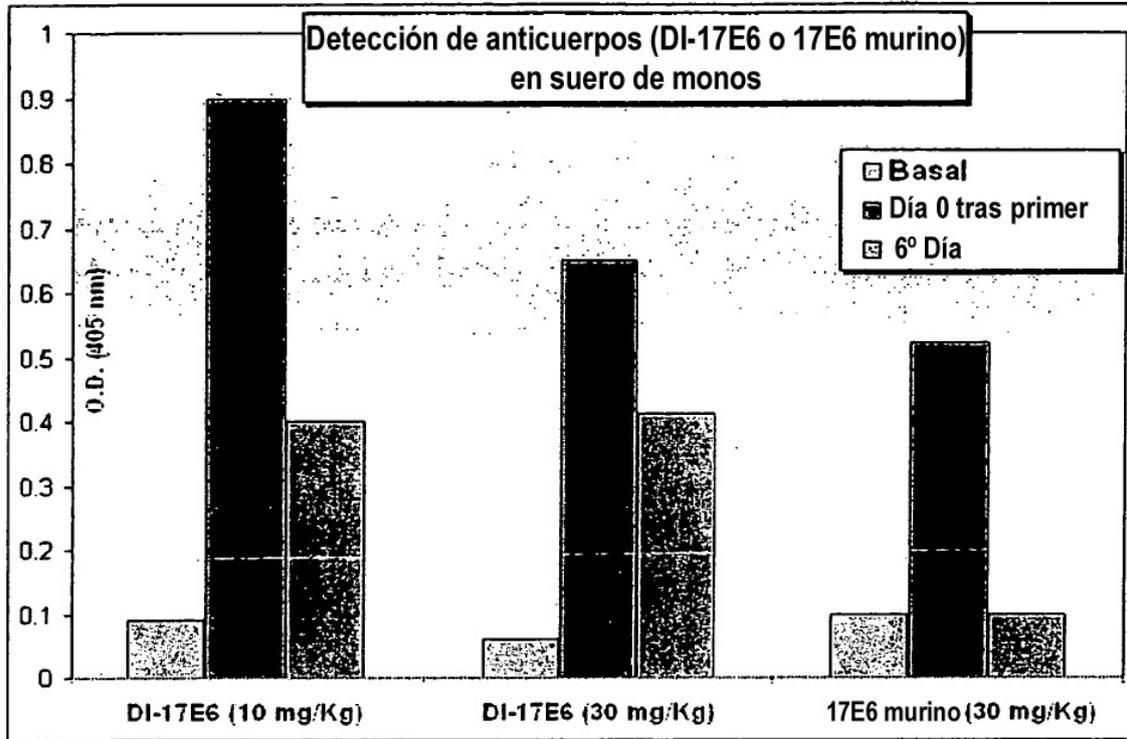


Figura 3

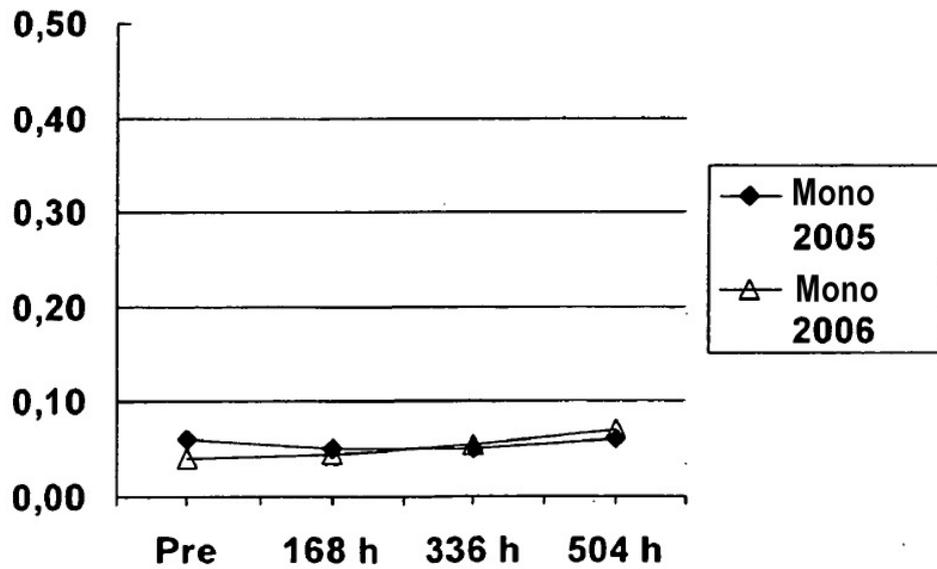


Figura 4:

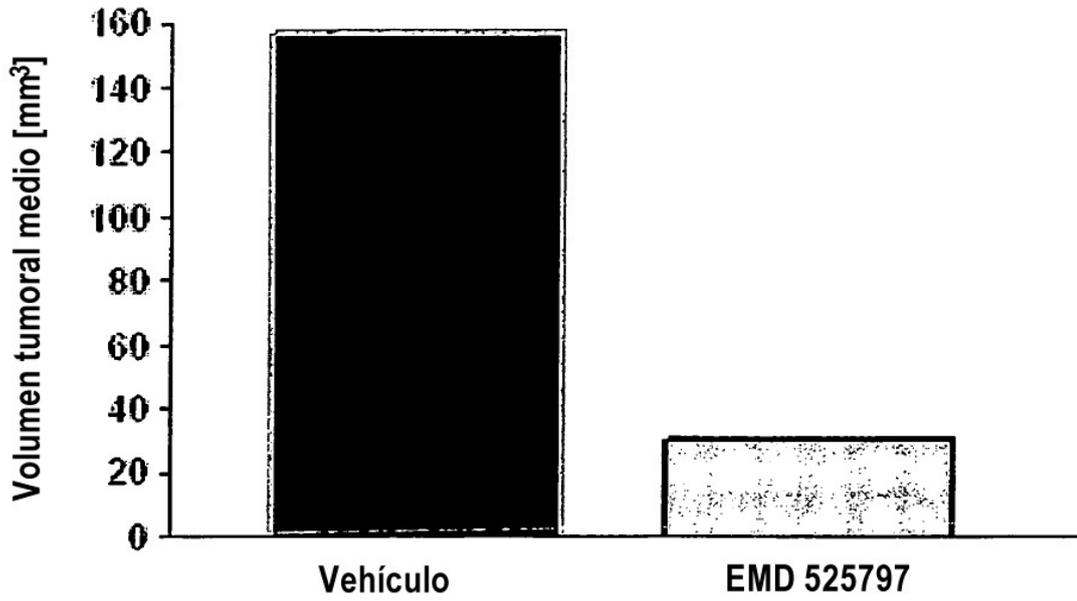


Figura 5:

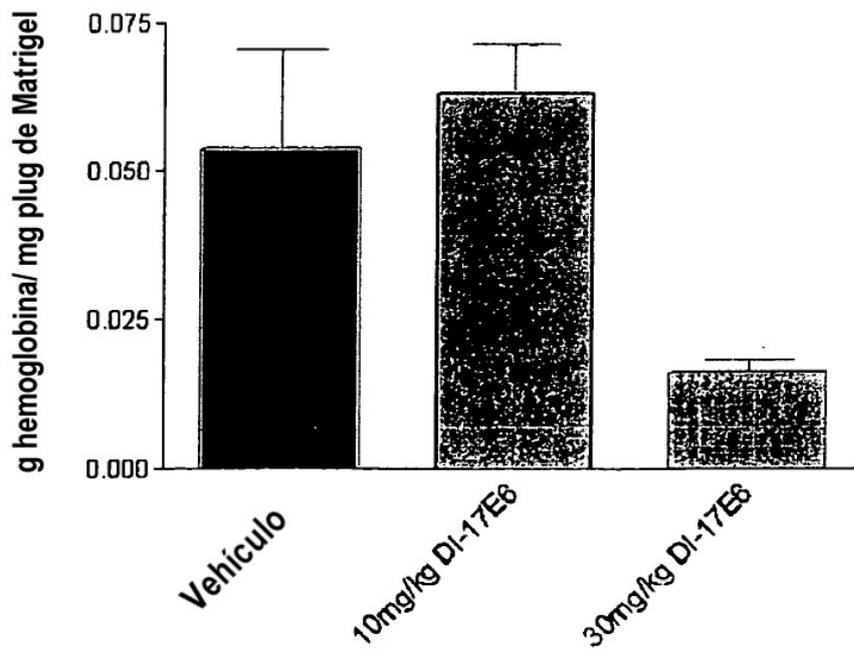


Figura 6:

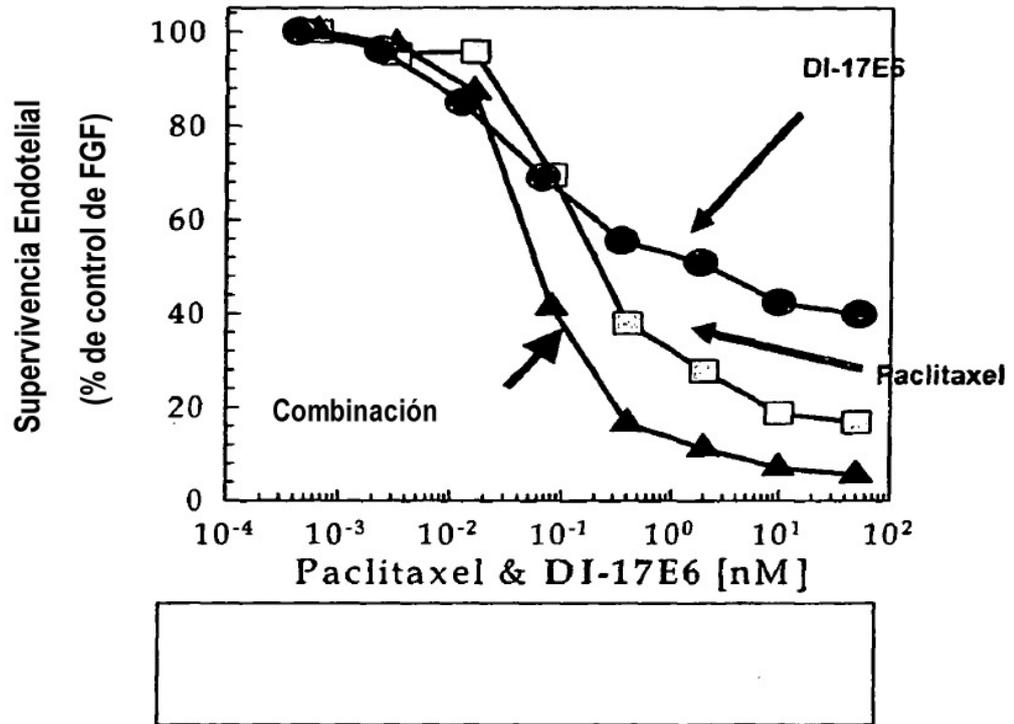


Figura 7:

Células M21

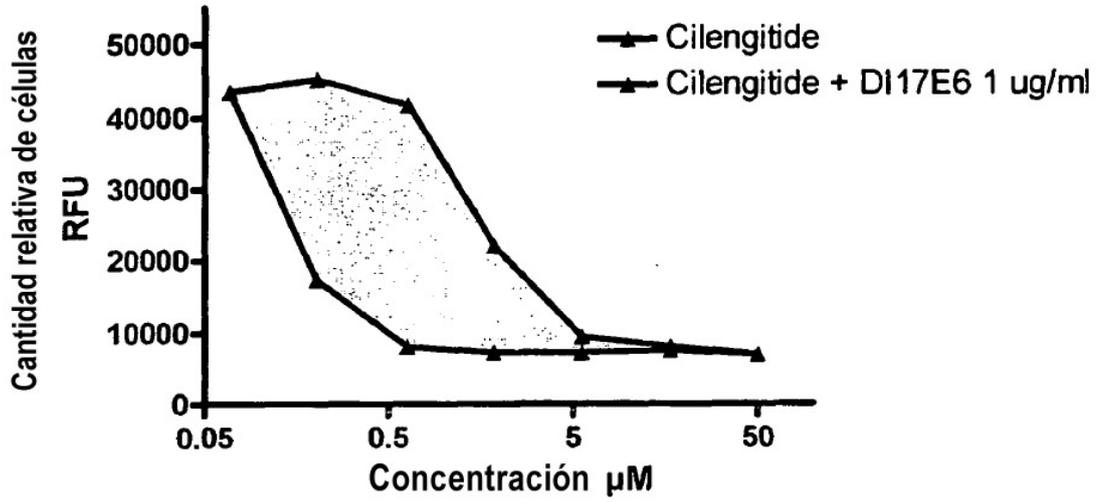


Figura 8:

Células CAKI-2

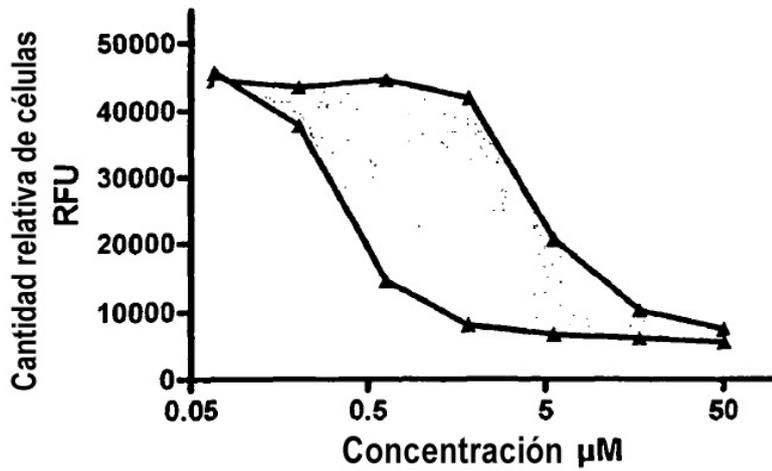


Figura 9:

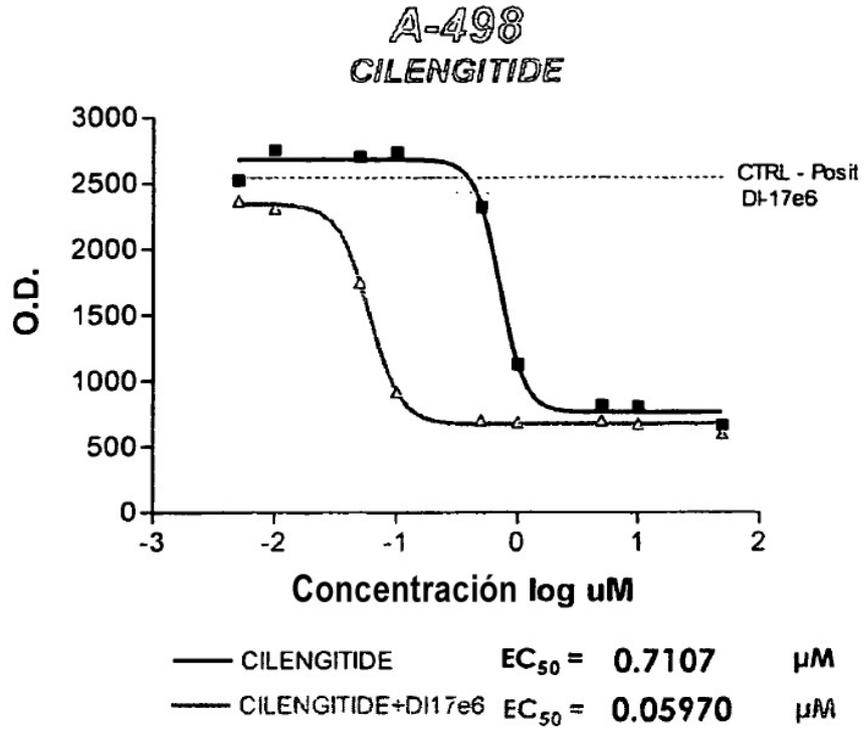


Figura 10:

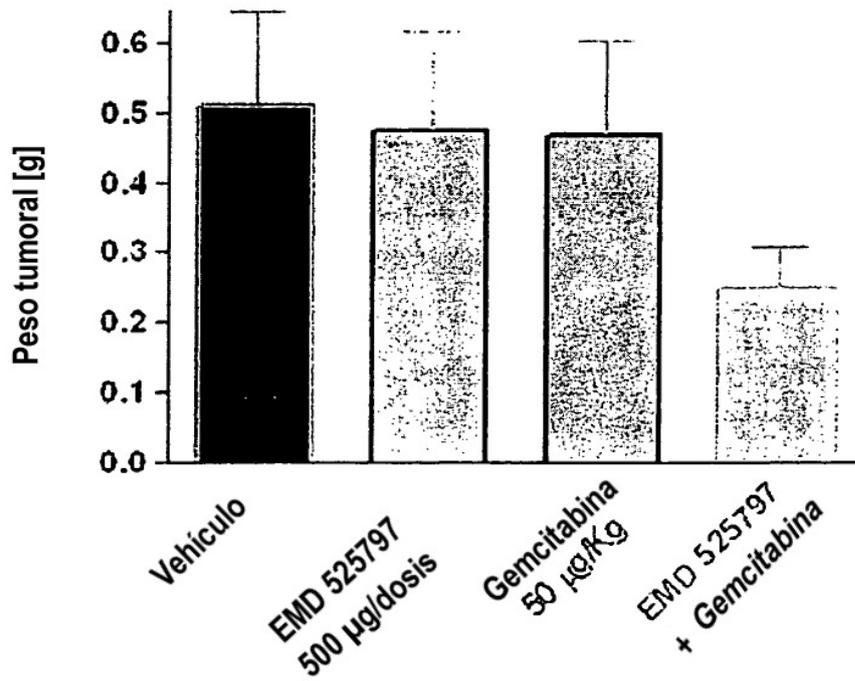


Figura 11:

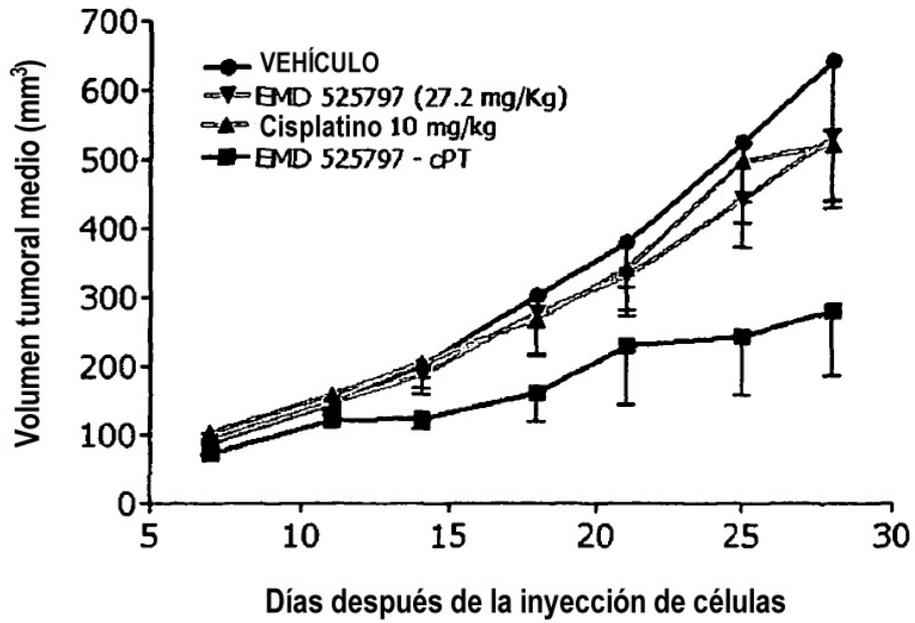


Figura 12:

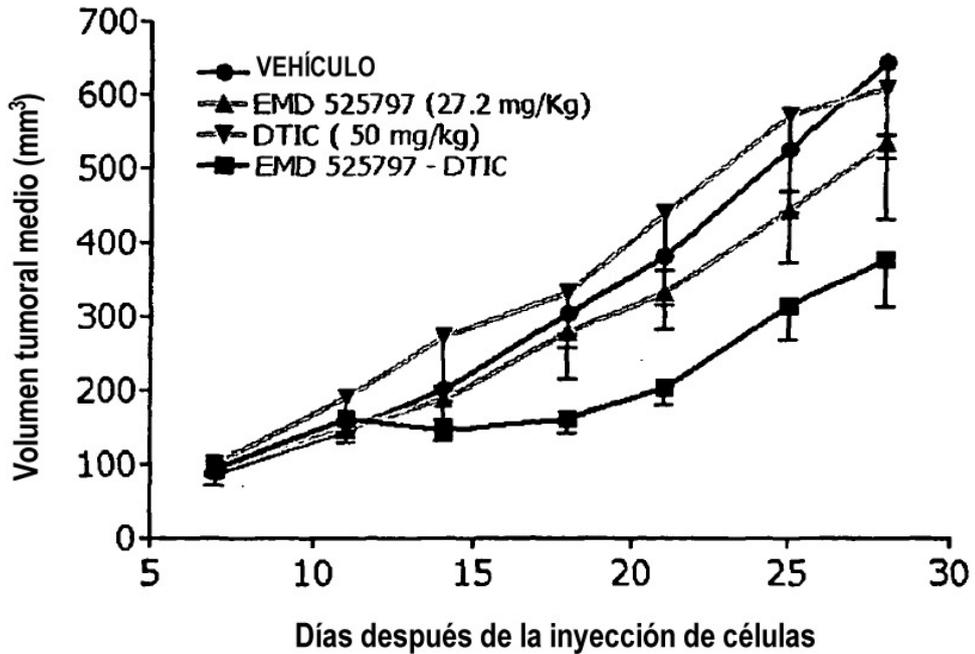


Figura 13:

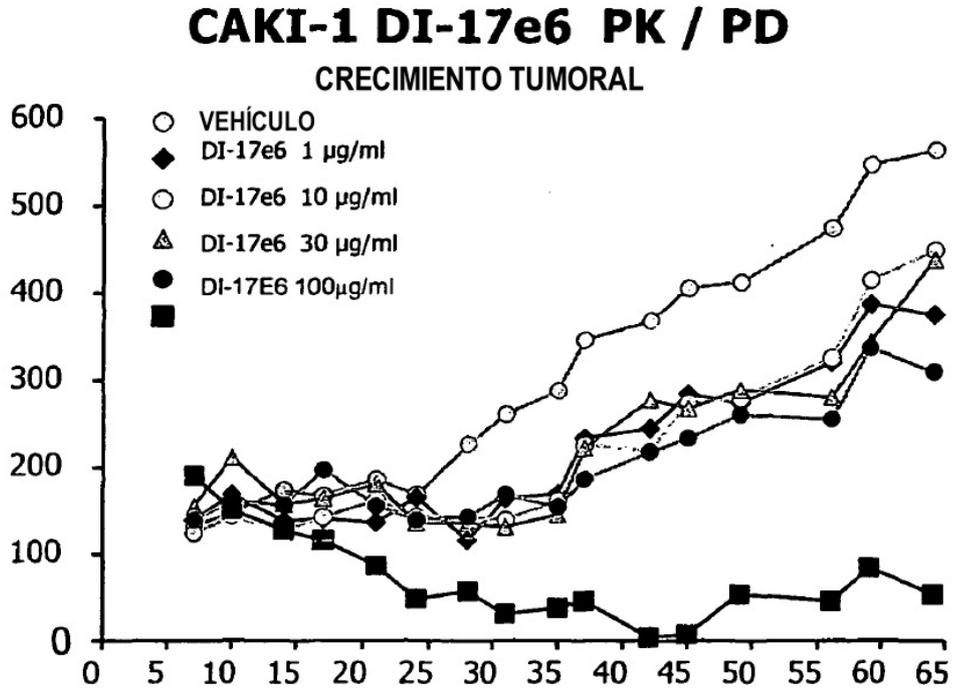


Figura 14:

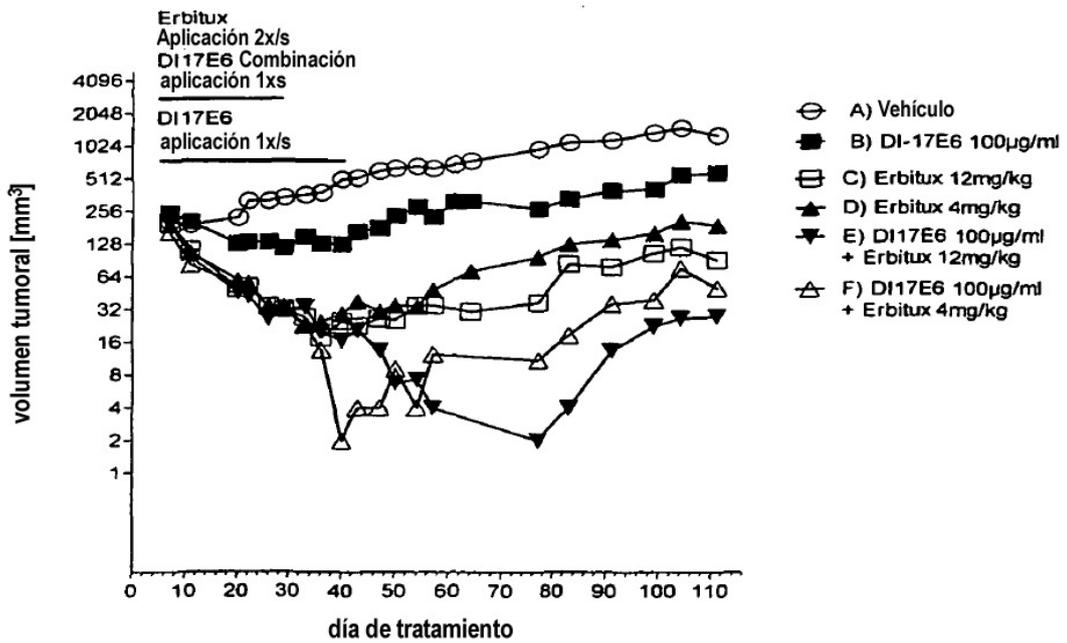


Figura 15

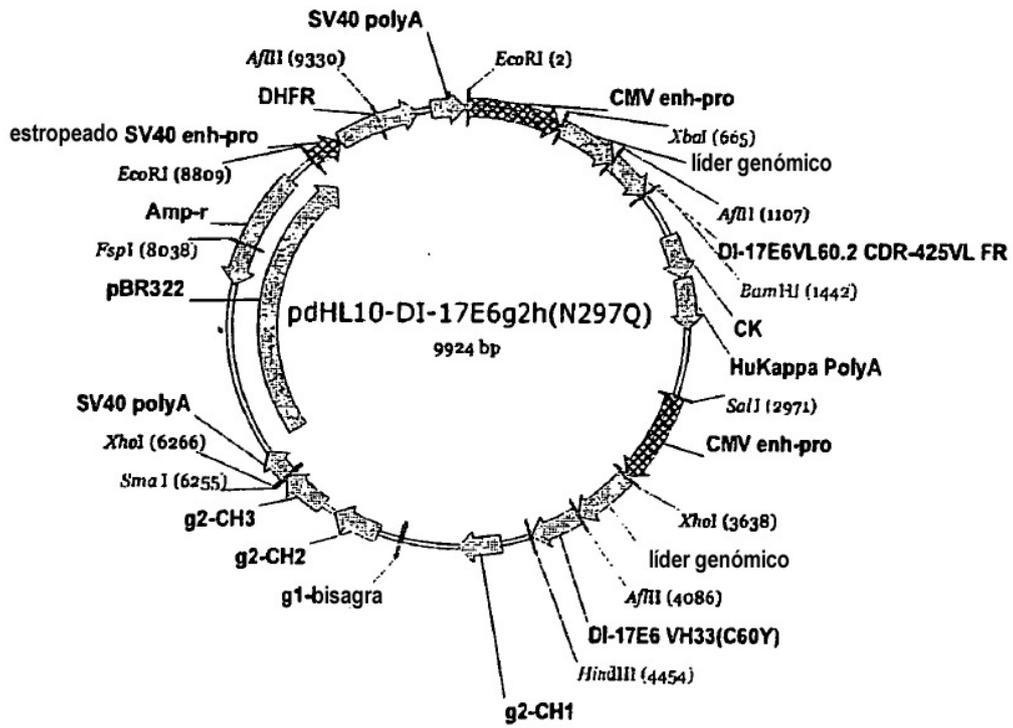


Figura 16

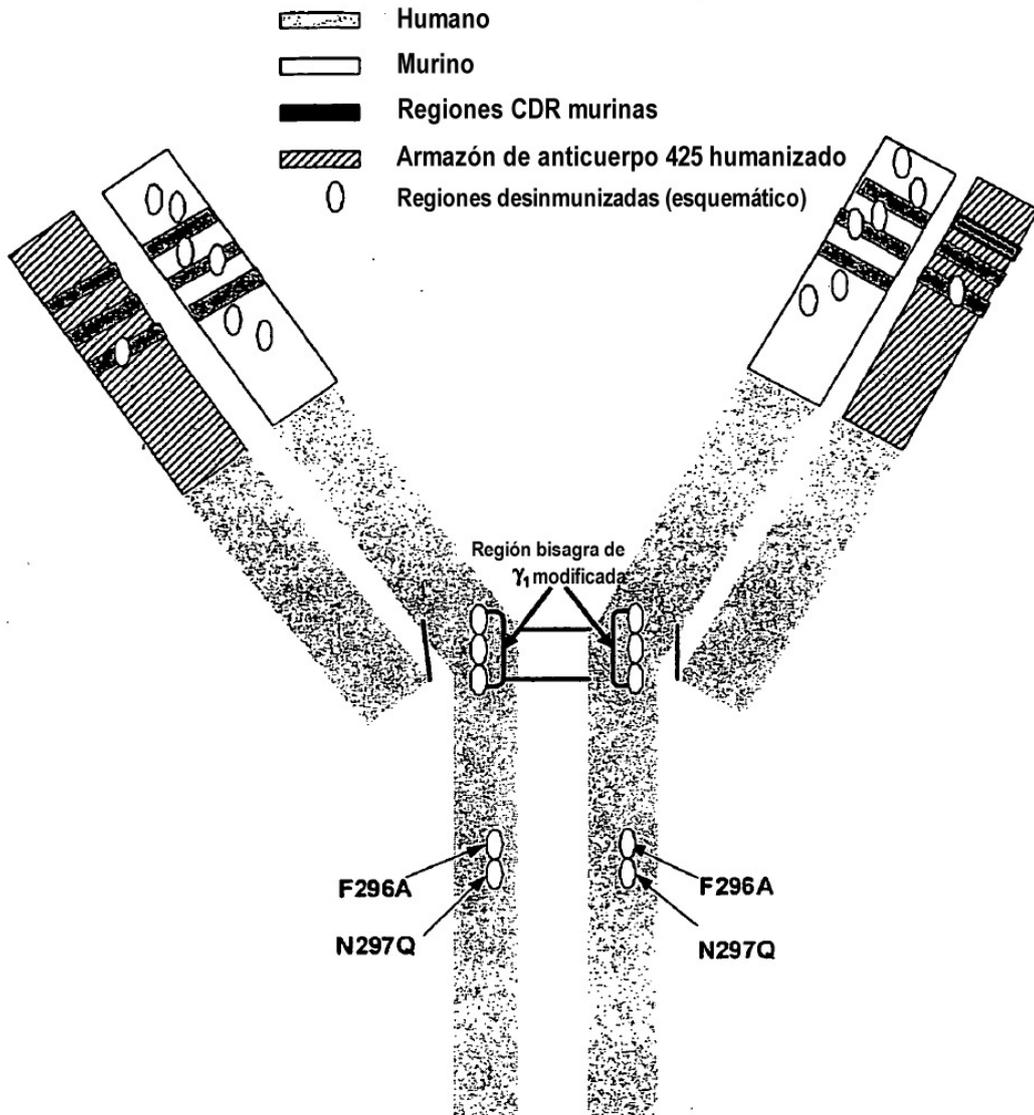


Figura 17A

ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGgtgaggagagaggggaagtg
 agggaggagaatggacagggagcaggagcactgaatcccatgctcattccatgtattctggcat
 gggtgagaagatgggtcttatcctccagcatggggcctctggggtgaatacttgtagagggagg
 ttccagatgggaacatgtgctataatgaagattatgaaatggatgcctgggatggtcctaagtaat
 gcctagaagtgactagacaettgcaattcacttttttggtaagaagagatttttaggctataaa
 aaaatggtatgtaaaaaataaacatcacagttgaaataaaaaaaaaataaaggatggtcatgaatt
 ttgtgtataactatgtatttctctctcattggttcagCTTCCTTAAGCGACATCCAGATGACCCA
 GAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGGCAAGTCAGG
 ACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTAC
 TACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTGACGGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTA
 CACCTTACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAGGGTAATA
 CGTTTCCGTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACgtaagtggatcccgaattc
 taaactctgaggggggtcggatgacgtggccattctttgcctaaagcattgagtttactgcaagg
 cagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaaagagctccaacaaaaaatttagaacttta
 ttaaggaatagggggaagctaggaagaaaactcaaacatcaagattttaatacgccttcttggtc
 tccttgctataattatctgggataagcatgctggtttctgtctgtccctaacatgccctgtgatt
 atccgcaaacacacaccaagggcagaactttgttacttaaacaccatcctggttcttcttct
 ctcaGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
 CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 TAG SEQ ID No. 27

Figura 17B

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCAC
 CTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTC
 CAAAGCTGCTGATCTACTACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTGACGGGTAGC
 GGTAGCGGTACCGACTACACCTTACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTA
 CTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
 SEQ ID No. 29

Figura 17C

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
 TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGG
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
 TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG
 CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 SEQ ID No. 31

Figura 18A

ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGgtgaggagagaggggaagtg
 agggaggagaatggacagggagcaggagcactgaatcccattgctcattccatgtattctggcat
 gggtgagaagatgggtcttatcctccagcatggggcctctgggtgaatacttgtagagggagg
 tccagatgggaacatgtgctataatgaagattatgaaatggatgcctgggatgggtctaagtaat
 gcctagaagtgactagacacttgcaattcacttttttggtaagaagagatttttaggctataaa
 aaaatgttatgtaaaaaataaacatcacagttgaaataaaaaaaaaatataaggatgttcatgaatt
 ttgtgtataactatgtatttctctctcattgtttcagCTTCCTTAAGCCAGGTCCAGCTTCAGCA
 GTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACA
 CCTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGA
 TACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGGGACAAGGCCACAATGAC
 TACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAG
 TCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACCGTC
 ACCGTCTCCTCAGgtgagtaagctttctggggcgagccgggcctgactttggctttggggcaggg
 agtgggctaaggtgaggcaggtggcgccagccaggtgcacacccaatgcccgtgagcccagacac
 tggaccctgcctggaccctcgtggatagacaagaaccgaggggcctctgcgctgggcccagctc
 tgtcccacaccgcggtcacatggcaccacctctcttgcagCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTT
 CCCCCGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
 ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACC
 TTCCAGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG
 CAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACA
 AGACAGTTGgtgagagggcagctcagggagggaggggtgtctgctggaagccaggtcagccctcc
 tgcttgagcgcaccccggctgtgagccccagcccagggcagcaaggcagggcccatctgtctcc
 tcaccggaggcctctgcccggcccaactcatgctcagggagaggggtcttctggctttttccacca
 ggctccaggcagggcaggtggtgcccctaccccagggccttcacacacaggggcaggtgctt
 ggctcagacctgcaaaaagccataccgggaggaccctgcccctgacctaaagccgaccccaagg
 ccaaactgtccactccctcagctcggacaccttctctcctcccagatccgagtaactcccaatct
 tctctctgcag**AGCCCAAATCTTCTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCCA**Ggtaagccag
 cccaggectcgccctccagctcaaggcgggacaggtgcctagagtagcctgcatccagggacag
 gcccagctgggtgctgacagctccacctccatctcttctcctcagCACACCTGTGGCAGGACCGT
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAGG
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGgtgggaaccgcggggtatg
 agggccacatggacagagggcggctcggcccaccctctgcctgagagtgaccgctgtaccaacc
 tctgtccctacagGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGAT
 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCC
 CGGGTAAATGA
 SEQ ID No. 33

Figura 18B

CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTG
CAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGG
GTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGG
GACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAG
ATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGG
GTCAAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCA SEQ ID No. 35

Figura 18C

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAATCAG
GCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT**GAGCCCAAATCTTCTGACAAA**ACTCACACAT
GCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCAC
GGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGG
CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCACGGGAGG
AGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCCCCGGGTAAA SEQ ID No. 37

Figura 18D

GAGCCCAAATCTTCTGACAAA**ACTCACACATGCCCACCGTGCCCA** SEQ ID No. 39

Figura 19A

CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCTTG
 CAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCCCTGGACAGG
 GTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGG
 GACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAG
 ATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGG
 GTCAAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
 CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 CGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTG
 TCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGC
 ACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGA
GCCCAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCACC**CGTGCC**AGCACCACTGTGGCAGGACCGT
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAGG
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
 GGTGTACACCTGCCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
 TCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 TACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA SEQ ID No. 41

Figura 19B

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCAC
 CTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTC
 CAAAGCTGCTGATCTACTACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGC
 GGTAGCGGTACCGACTACACCTTACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTA
 CTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAA
 CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCC
 TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA
 CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
 GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 SEQ ID No. 43

Figura 20A

DIQMTQTSSLSASLGDRV I I **SCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLI FYTSKLH**
SGVPSRFSGSGSGTDYSLT I SNLDQEDIATYFCQQGNTPPYTFGGGTKVEMR
 (SEQ ID No. 25):

Figura 20B

QVQLQQSGAELAEPGASVKMSCKASGYTFSS**SFWMHWKQ**RPQGLEWIGYIN**PRS**
GYTECNEIFRDKATMTADTSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAS**FLGRGAMDY**WGQ
 GTSVTVSS (SEQ ID No. 26):

Figura 21A

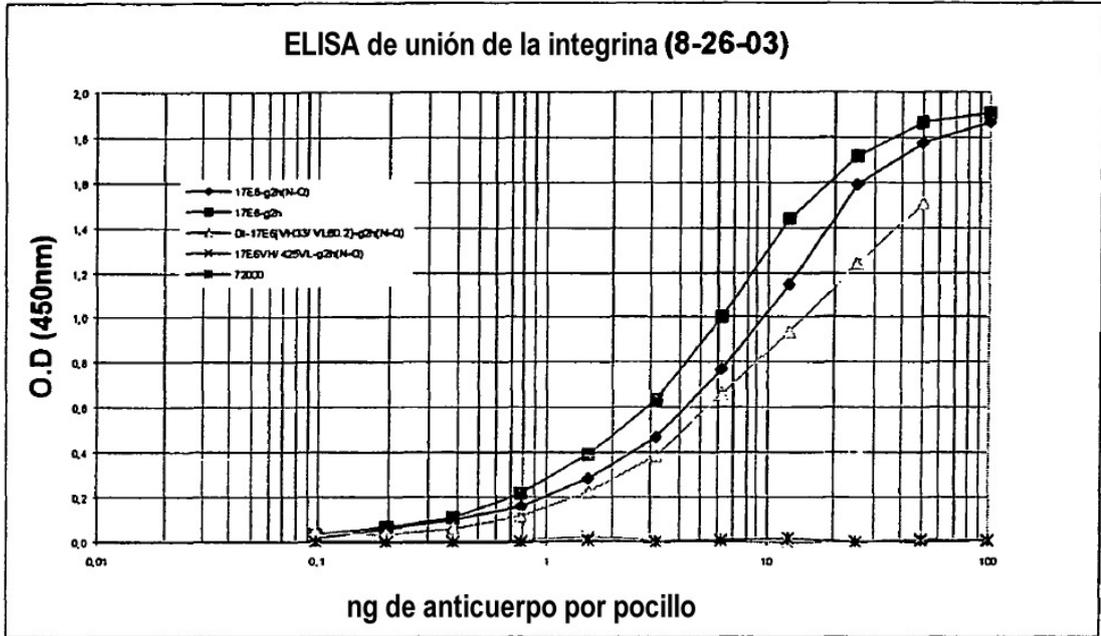


Figura 21B

