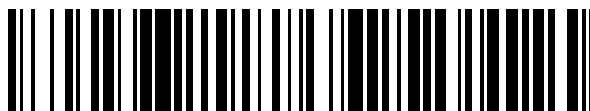


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 704**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2006 E 06733638 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1838736**

54 Título: **Moléculas de unión a Cripto**

30 Prioridad:

05.01.2005 US 641691 P

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

21.06.2013

73 Titular/es:

**BIAGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**GLASER, SCOTT;
VAN VLIJMEN, HERMAN;
LUGOVSKOY, ALEXEY ALEXANDROVICH;
SANICOLA-NADEL, MICHELE;
WU, XIUFENG;
GARBER, ELLEN y
SALDANHA, JOSE WILLIAM**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 408 704 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

Moléculas de unión a Cripto.

Antecedentes de la invención

5 Los anticuerpos, y sus diversas formas modificadas, son agentes terapéuticos eficaces que actualmente se utilizan para tratar a pacientes que padecen una serie de trastornos. Algunos de estos anticuerpos reconocen antígenos presentes en la superficie de las células tumorales. Cripto es una proteína de superficie celular de 188 aminoácidos sobrexpresada por muchas células tumorales. Se aisló cripto en una exploración de cDNA de una genoteca de carcinoma embrionario humano (Ciccociola et al, 1989, EMBO J. 8:1987-91). Cripto se clasificó originalmente como un miembro de la familia EGF (Ciccociola et al., *supra*); no obstante, el análisis subsiguiente demostró que Cripto no se unía a ninguno de los receptores EGF conocidos y su dominio de tipo EGF era en realidad divergente de la familia EGF (Bianco et al., 1999, J. Biol Chem. 274:8624-29).

15 La sobrexpresión de la proteína Cripto se asocia con tumores en muchos tejidos (incluidos, aunque sin limitarse a ello, los de cerebro, mama, testículo, colon, pulmón, ovario, vejiga, cuello uterino, páncreas y estómago). Panico et al., 1996, Int. J. Cancer 65:51-56; Byrne et al., 1998, J. Pathology 185:108-11; De Angelis et al, 1999, Int J. Oncology 14:437-40. Adkins et al., 2003, J. Clin. Invest 112(4): 575-587 describe que el bloqueo del anticuerpo del dominio CFC de Cripto suprime el crecimiento de células tumorales *in vivo*. El documento US 2004/0176576 describe un ligando aislado de una proteína a Cripto-1. Lepage et al. Proceedings of the 94 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2003 julio 11-14, AACR, 44:145, Abstract #749 describe que un anticuerpo anti-Cripto conjugado al fármaco maitansinoide, DM1, causa la regresión de tumores preformados en modelos tumorales de xenoinjerto humanos.

20 Se han descrito anticuerpos murinos que se unen a Cripto. No obstante, si bien los anticuerpos murinos tienen aplicabilidad como agentes terapéuticos en seres humanos, dado que no son de origen humano pueden ser inmunogénicos. La administración de dichos anticuerpos puede resultar en una respuesta de anticuerpos neutralizadores (respuesta de anticuerpo antimurino humano (HAMA)), que es particularmente problemática si se desea administrar los anticuerpos repetidamente, p. ej., en el tratamiento de una enfermedad crónica o recurrente. Además, dado que contienen dominios constantes murinos, no pueden exhibir funciones efectoras humanas.

25 En un esfuerzo por aliviar las inquietudes de inmunogenicidad, con frecuencia se producen anticuerpos "humanizados". En un protocolo, las CDR de un anticuerpo de origen de ratón se transfieren a las regiones de marco humanas que resultan en un anticuerpo "injertado de CDR". Con frecuencia, los residuos de aminoácidos que podrían afectar potencialmente la unión del antígeno en la región de marco se retromutan al correspondiente residuo de ratón.

30 No obstante, si bien se desean los anticuerpos humanizados por su baja inmunogenicidad potencial en seres humanos, su producción es impredecible. Por ejemplo, la modificación de secuencias de anticuerpos puede resultar en pérdida sustancial o incluso total de afinidad de unión a antígenos, o pérdida de especificidad de unión. Asimismo, a pesar de la modificación de secuencias, los "anticuerpos humanizados" pueden incluso exhibir inmunogenicidad en seres humanos. El desarrollo de anticuerpos anti-Cripto humanizados sería muy beneficioso para inhibir las consecuencias de la expresión de Cripto en las células de pacientes. Además, el desarrollo de dichos anticuerpos proporcionaría un medio para direccionar las células tumorales positivas de Cripto con el fin de suministrar agentes antitumorales tales como toxinas, radiomarcadores y similares.

40 Compendio de la invención

La descripción, que incluye la presente invención, se basa por lo menos en parte, en el desarrollo de anticuerpos injertados con CDR humanas y otros anticuerpos anti-Cripto humanizados. Como se describirá en más detalle a continuación, se desarrollaron múltiples formas de anticuerpos anti-Cripto humanizados y se conjugaron a maitasinoïdes para ensayar el crecimiento de tumores en modelos animales. Los resultados se presentan en los presentes ejemplos que demuestran la utilidad de estos anticuerpos para la inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo*. Estos anticuerpos anti-Cripto humanizados son más adecuados que los anticuerpos de ratón para uso en sujetos humanos.

50 Se han efectuado tanto anticuerpos humanizados de longitud total como anticuerpos humanizados que carecen del dominio CH2. Las composiciones de anticuerpos que carecen del dominio CH2 comprenden una mezcla de moléculas de unión dimericas que comprenden diferentes isoformas (moléculas que comprenden dos porciones de cadena pesada en las que una fracción de las moléculas comprende dos porciones de cadena pesada que están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas (Forma A) y una porción de las moléculas comprende dos porciones de cadena pesada que no están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas (Forma B)). Una forma o la otra puede obtenerse preferencialmente, p. ej., por separación usando cromatografía de interacción hidrófoba o por inclusión de péptidos conectores sintéticos que producen biosíntesis

- preferencial o bien de la Forma A o de la Forma B. Los péptidos conectores de la descripción pueden incluirse en cualquier molécula dimérica que tienda a formar tanto la Forma A como la Forma B, p. ej., moléculas de anticuerpos, moléculas de anticuerpos que carecen del dominio (p.ej., que carecen de todo o parte del dominio CH2), minicuerpos, diacuerpos, proteínas de fusión, etc. En un ejemplo preferido, se potencia la formación de la Forma A.
- 5 Los dímeros del polipéptido de la Forma A exhiben mejor estabilidad *in vitro* y mejor biodistribución *in vivo*.
- En base a la descripción del presente documento, la presente invención da a conocer una molécula de unión que comprende:
- (a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR y marco que se indican en la secuencia VL seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 47 y en la SEQ ID NO: 50; y
- 10 (b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR y de marco que se indican en la secuencia VH seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 51;
- donde la molécula de unión se une específicamente a un antígeno de Cripto humano. Los aspectos y realizaciones adicionales se exponen en las reivindicaciones anejas.
- En una realización, la molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 47 y una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 48.
- 15 En una realización, la molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 47 y una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 49.
- 20 En una realización, la molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 47 y una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 51.
- En una realización, la molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 50 y una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 48.
- 25 En una realización, la molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 50 y una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 49.
- 30 En una realización, la molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 50 y una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 51.
- En una realización, la cadena pesada de la molécula de unión comprende un dominio CH3 genéticamente condensado al dominio VH, VL o CH1 mediante un péptido conector sintético.
- En una realización, las cadenas pesadas de la molécula de unión carecen de todo o parte de un dominio CH2.
- 35 En una realización, la molécula de unión comprende una región constante derivada de un anticuerpo de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- En una realización, la molécula de unión comprende la secuencia de aminoácidos derivada de una región bisagra seleccionada del grupo que consiste en: una bisagra γ 1, una bisagra γ 2, una bisagra γ 3 y una bisagra γ 4.
- En una realización, la molécula de unión comprende una bisagra quimérica.
- 40 En una realización, la molécula de unión comprende por lo menos una porción de un dominio bisagra IgG1, por lo menos una porción de un dominio bisagra IgG3.
- En una realización, la molécula de unión comprende una región constante de la cadena pesada que comprende un residuo cisteína en la posición 239 o 242 (sistema de numeración Kabat).
- 45 En una realización, la molécula de unión comprende una región constante de la cadena pesada que comprende por lo menos una modificación de aminoácido según lo comparado con la región Fc natural. En una realización, la modificación comprende una sustitución de aminoácido en cualquiera de las posiciones EU 297-299 de modo tal que la variante es prácticamente aglicosilada cuando se expresa en una célula mamífera.

En una realización, la molécula de unión comprende una función efectora reducida en comparación con una molécula de unión que tiene una región Fc natural.

En una realización, la molécula de unión tiene menor toxicidad dependiente del antígeno.

En una realización, la molécula de unión posee mejor semivida.

- 5 En una realización, la región Fc modificada posee por lo menos un residuo cisteína genéticamente modificado. En una realización, el residuo cisteína modificado genéticamente modificado está en el dominio CH3 de la región Fc.

En una realización, la invención pertenece a una molécula de unión que se conjuga a un resto efector. En una realización, el resto efector se selecciona del grupo que consiste en una citotoxina, un profármaco, una toxina biológica y un radioisótopo.

- 10 En una realización, el resto efector se conjuga mediante un enlace amida.

En una realización, el resto efector es un maitansinoide.

En una realización, la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 53 y la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 56.

- 15 En una realización, la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 53 y la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos de marco y CDR que se indican en la secuencia expuesta como la SEQ ID NO: 57.

En una realización, una molécula de unión comprende una región constante de la cadena pesada del isótopo γ 1.

- 20 En una realización, una molécula de unión comprende una secuencia de la región constante de la cadena pesada que se indica en la SEQ ID NO: 71.

En una realización, una molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 53 y la cadena pesada expuesta como SEQ ID NO: 58.

En una realización, una molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 54 y la cadena pesada tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 56.

- 25 En una realización, una molécula de unión comprende una cadena ligera que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 54 y la cadena pesada expuesta como SEQ ID NO: 57.

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 54 y la secuencia de cadena pesada expuesta como SEQ ID NO: 58.

En una realización, una molécula de unión de la invención es biespecífica.

- 30 En una realización, una molécula de unión de la invención es tetravalente.

En una realización, una molécula de unión de la invención es un anticuerpo de longitud total.

En una realización, una molécula de unión de la invención es un fragmento de anticuerpo.

- 35 En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Cripto humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se indica en la SEQ ID NO: 53 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se indica en la SEQ ID NO: 57, donde el anticuerpo se conjuga a un maitansinoide.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende dicha molécula de unión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 40 En otra realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una cadena pesada o ligera de dicha molécula de unión de la invención. En una realización, la molécula de ácido nucleico está en un vector.

En una realización, la invención se refiere a una célula hospedante que comprende dicho vector.

En otra realización, la invención se refiere a un método para producir dicha molécula de unión de la invención, que comprende cultivar una célula hospedante bajo condiciones tales como para que se produzca dicha molécula de unión, y aislar la molécula de unión de la célula hospedante o el cultivo.

En otro caso, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con una molécula de unión de la descripción, que comprende administrar la molécula de unión al sujeto de modo tal que ocurra el tratamiento.

- 5 En otro caso, la descripción se refiere a un método para tratar un tumor maligno, que comprende administrar una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-80 a un paciente que presenta un tumor maligno bajo condiciones tales que se exprese la molécula de unión, de modo tal que se trate el tumor maligno en el paciente.

En un ejemplo, el sujeto padece cáncer.

En un ejemplo, el método comprende además administrar un agente adicional.

- 10 En un ejemplo, el agente adicional es un agente quimioterapéutico.

En un ejemplo, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en natalizumab, trastuzumab, bevacizumab, infliximab, rituximab, ibritumomab tiuxetan, cetuximab, hidrocloreuro de levarnisol, tositumomab, alemtuzumab, IMC-C225, mesilato de imatrinib, fulvestrant, anastrozol, exemestano, letrozol, tamoxifeno, interferón alfa, denileucina difitox, oblimersen, erlotinib HCL bortezomib, talidomida, y endostatina.

- 15 En otro ejemplo, la descripción se refiere a un método para inhibir los efectos de la expresión de Cripto en una célula de un paciente, que comprende administrar al paciente una dosis eficaz de una molécula de unión de la descripción.

En un ejemplo, la dosis eficaz de la molécula de unión es de por lo menos aproximadamente 5 mg/kg.

En otro ejemplo, la dosis eficaz de la molécula de unión es de por lo menos aproximadamente 10 mg/kg.

- 20 En un ejemplo, la molécula de unión se administra por vía intraperitoneal, oral, intranasal, subcutánea, intramuscular, tópica o intravenosa.

En un ejemplo, el paciente padece cáncer en un órgano seleccionado del grupo que consiste en cerebro, mama, testículo, colon, pulmón, ovario, vejiga, cuello uterino, páncreas y estómago.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1A (SEQ ID NO: 1) indica la secuencia de DNA del anticuerpo monoclonal anti-CRIPTO quimérico que carece del dominio CH2 de la cadena pesada que consiste en los dominios variables de las cadenas pesada y ligera murinos condensados a los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanos, respectivamente (chB3F6) que contienen el péptido que contiene la bisagra GI/G3/Pro243Ala244Pro245 + [GhySer]. La Figura 1B (SEQ ID NO: 2) indica la secuencia de DNA de chB3F6 que carece del dominio CH2 de la cadena ligera.

- 30 La Figura 2A (SEQ ID NO: 3) indica la secuencia de aminoácidos de chB3F6 que carece del dominio CH2 de la cadena ligera que contiene el péptido que conecta la bisagra GI/G3/Pro243Ala244Pro245 + [GlySer]. La Figura 2B (SEQ ID NO: 4) indica una secuencia de aminoácidos de chB3F6 que carece del dominio CH2 de la cadena ligera.

La Figura 3 indica que la inclusión del péptido conector GI/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) al anticuerpo chB3F6 que carece del dominio CH2 resulta en la producción de esencialmente todo el anticuerpo de la Forma A con poca o ninguna Forma B detectable (véase vía 4).

- 35 La Figura 4 indica que el anticuerpo del dominio B3F6 (chB3F6) quimérico y que carece del dominio B3F6 quimérico que comprende un péptido conector (B3F6ACH2 GI/G3/Pro243Ala244Pro245) compite de igual manera para unión a células tumorales GEO.

- 40 La Figura 5 indica una alineación de las cadenas ligeras de la región variable de la cadena ligera de B3F6 murino, el aceptor humano, y las diversas formas humanizadas elaboradas. Las secuencias CDR están sombreadas. Las diferencias en los residuos de aminoácidos FR entre donante y aceptor están en negrita. Las retromutaciones realizadas se indican en negrita y letra minúscula. Los números Kabat se indican en la parte superior de la alineación.

- 45 La Figura 6 indica una alineación de las cadenas pesadas de la región de cadena pesada de B3F6 murino donante, el aceptor humano, y las diversas formas humanizadas preparadas. Las secuencias CDR están sombreadas. Las diferencias en residuos de aminoácidos FR entre el donante y el aceptor están en negrita. Las retromutaciones efectuadas se indican en negrita y en letra minúscula. Los números Kabat se indican en la parte superior de la alineación.

La Figura 7 indica la secuencia de región constante utilizada para elaborar anticuerpos que carecen del dominio (que comprenden un péptido conector bisagra (HCP)) y la secuencia de región constante IgG1 de longitud total utilizada para elaborar anticuerpos de longitud total.

5 La Figura 8 exhibe una comparación de la unión de B3F6 que carece del dominio quimérico con la versión 1 y la versión 2 de B3F6 humanizado que carece del dominio.

La Figura 9 exhibe una comparación de la unión de B3F6 que carece del dominio quimérico B3F6 con la versión 3, la versión 4, la versión 5 y la versión 6 de B3F6 humanizado que carece del dominio.

10 La Figura 10 indica el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 en tumores de xenoinjerto BT-474 consolidados en ratones atímicos según lo medido por el cambio en el peso del tumor. El conjugado B3F6.1-DM4 se administró en una dosis de 15 mg/kg iv cada siete días durante tres meses (q7dx3) más Día 43 (n=8) o q7dx3 más 25 mg/kg en el Día 43 (n=8), B3F6.1-DM4 se administró en una dosis de 35 mg/kg iv q7dx3 (n=8) o en los Días 15, 22, 33 y 36 (n=8), el vehículo (n=16) se administró iv q7dx3 y Taxol (n=7) se administró ip q4dx3 comenzando el Día 15. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias.

15 Los paneles A y B de la Figura 11 muestran el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 en tumores de xenoinjerto BT-474 de ratones atímicos. Los ratones que portan los tumores de mama humanos BT-474 consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 en una dosis de 15 mg/kg iv q7dx3 más Día 43 (n=8) o q7dx3 más 25 mg/kg en el Día 43 (n=8), B3F6.1-DM4 en una dosis de 35 mg/kg iv q7dx3 (n=8) o en los Días 15, 22, 33 y 36 (n=8), vehículo (n=16) iv q7dx3 y Taxol (n=7) IP q4dx3 comenzando el Día 15. El panel A indica los pesos tumorales individuales el Día 58. El panel B indica los pesos tumorales individuales del resto de los grupos de tratamiento el Día 76. Cada punto representa el peso del tumor de un solo ratón, y las barras horizontales representan el peso del tumor para cada grupo.

25 La Figura 12 indica el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 y taxol en tumores de xenoinjerto BT-474 consolidados en ratones atímicos. La figura exhibe una comparación de los tamaños de los tumores de la media del grupo de ensayo como porcentaje del tamaño del tumor de control vehículo de la media. Los ratones atímicos que portan los tumores de mama humanos BT-474 consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 en una dosis de 15 mg/kg iv q7dx3 más Día 43 (n=8) o q7dx3 más 25 mg/kg en el Día 43 (n=8), B3F6.1-DM4 en una dosis 35 mg/kg iv q7dx3 (n=8) o en los Días 15, 22, 33 y 36 (n=8), vehículo (n=16) iv q7dx3 y Taxol (n=7) ip q4dx3 comenzando el Día 15. Las barras horizontales representan los criterios del National Cancer Institute (Instituto Nacional del Cáncer) para actividad (42%).

30 La Figura 13 indica el peso corporal de la media de ratones atímicos implantados con tumores de mama humanos BT-474 con B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o taxol. Los ratones se trataron con B3F6.1-DM4 en una dosis de 15 mg/kg iv q7dx3 más Día 43 (n=8) o q7dx3 más 25 mg/kg en el Día 43 (n=8), B3F6.1-DM4 en una dosis de 35 mg/kg iv q7dx3 (n=8) o en los Días 15, 22, 33 y 36 (n=8), vehículo (n=46) iv q7dx3 y Taxol (n=7) ip q4dx3 comenzando el Día 15. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias.

35 La Figura 14 indica el efecto de huB3F6-DM4 que carece del dominio (dd) sobre células de cáncer de mama BT-474 según lo medido por el cambio en los pesos de los tumores. Se observó un efecto significativo con anticuerpo conjugado a DM-4 en una dosis de 18 mg/kg, 10 mg/kg cuando se administran 5 dosis, y taxol en 25 mg/kg.

40 La Figura 15 indica el efecto de huB3F6-DM4 que carece del dominio (dd) sobre células de cáncer BT-474 según lo medido por el cambio en los pesos de los tumores. Los animales volvieron a recibir dosis después de tres semanas de regresión/estasis. Se observó un efecto significativo con anticuerpo conjugado a DM-4 en dosis de 10 mg/kg y con Taxol en dosis de 25 mg/kg.

La Figura 16 indica el efecto de huB3F6-DM4 que carece de dominio (dd) sobre células de cáncer BT-474. El peso del tumor se muestra como porcentaje del peso del tumor/control vehículo. Tanto Taxol como 10 mg/kg de huB3F6-DM4 redujeron el peso del tumor en 50% o más.

45 La Figura 17 indica el efecto de huB3F6-DM4 que carece de domino (dd) sobre células de cáncer BT-474 según lo medido por un cambio en los pesos de los tumores. Los animales recibieron dosis los días lunes, miércoles, viernes y lunes, 7/8 animales permanecieron en el grupo 7.

50 La Figura 18 indica el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o a Cis-platino en tumores de xenoinjerto NCCIT consolidados en ratones atímicos, como se indica por el cambio en el peso del tumor. B3F6.1-DM4 a 6 (n=8), 10 (n=8), 15 (n=8) y 25 (n=8) mg/kg se administró iv q7dx3 (como lo indican las flechas), el vehículo (n=16) se administró iv q7dx3 y el cis-platino (n=8) se administró sc 2 mg/kg 3x/sem. x 6 comenzando el Día 15. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias.

Los paneles A y B de la Figura 19 indican el efecto de B3F6.1-DM4 de longitud total sobre tumores en ratones atímicos en un diagrama de dispersión. Los ratones atímicos que portan tumores testiculares humanos NCCIT

consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 a 6 (n=8), 10 (n=8), 15 (n=8) y 25 (n=8) mg/kg iv q7dx3, vehículo (n=16) iv q7dx3 y cis-platino (n=8) SC 3x/sem. x 4 comenzando el Día 15. El panel A muestra los pesos de los tumores individuales en el Día 70. El panel B muestra los pesos de los tumores individuales del resto de los grupos de tratamiento en el Día 107. Cada punto representa el peso del tumor de un solo ratón, y las barras representan el peso del tumor de la media para cada grupo.

La Figura 20 indica el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o cis-platino en tumores de xenoinjerto NCCIT consolidados en ratones atímicos. La figura muestra una comparación de los tamaños de los tumores de la media del grupo de ensayo como porcentaje del tamaño del tumor de control con vehículo de la media. Los ratones atímicos que portaban los tumores testiculares humanos NCCIT consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 a 6 (n=8), 10 (n=8), 15 (n=8) y 25 (n=8) mg/kg iv q7dx3, vehículo (n=16) IV q7dx3 y cis-platino (n=8) SC 3x/sem. x 4 comenzando el Día 15, La barra indica los criterios del National Cancer Institute para actividad (42%).

La Figura 21 indica el peso corporal de la media de ratones implantados con tumores de xenoinjerto NCCIT y tratados con B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o cis platino. Los ratones se trataron con B3F6.1-DM4 a 6 (n=8), 10 (n=8), 15 (n=8) y 25 (n=8) mg/kg iv q7dx3, vehículo (n=16) iv q7dx3 y cis-platino (n=8) SC 3x/sem. x 4 comenzando el Día 15. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias.

Los paneles A y B de la Figura 22 indican el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 dosificado el Día 15 y tras el recrecimiento o cisplatino en tumores de xenoinjerto NCCXT consolidados en ratones atímicos como se demuestra con el cambio en el peso del tumor. B3F6.1 -DM4 se administró a 25 (n=8) mg/kg iv una vez por día el Día 15, B3F6.1-DM4 se administró a 10 (n=8) mg/kg iv en los Días 15, 37 y 44^a, el vehículo se administró (n=16) iv q7dx3 y el cis-platino (n=8) se administró sc a 2 mg/kg 3x/sem. x 6 comenzando el Día 15. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias. El panel A muestra los datos combinados de todos los ratones dosificados con 10 mg/kg. El panel B muestra los datos de todos los ratones (n=5) dosificados con 10 m/kg en el Día 15 y 37 separados de los datos de los ratones (n=3) dosificados con 10 mg/kg en el Día 15, 37 y 44.

^aEn el Día 44 recibieron la dosis solamente tres ratones cuyos tumores demostraban un crecimiento progresivo.

Los paneles A y B de la Figura 23 muestran el efecto de B3F6.1-DM4 de longitud total sobre tumores de ratones atímicos según lo medido por un cambio en el peso del tumor. Los ratones que portaban tumores testiculares humanos NCCIT consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 a 25 (n=8) mg/kg iv una vez al día en el Día 15, B3F6.1-DM4 a 10 (n=8) mg/kg iv en el Día 15, 37 y 44^a, vehículo (n=16) iv q7dx3 y cis-platino (n=8) sc 2 mg/kg 3x/sem. x 6 comenzando el Día 15. El panel A indica los pesos de los tumores individuales en el Día 70. El panel B indica los pesos de los tumores individuales del resto de los grupos de tratamiento el Día 107. Cada punto representa el peso del tumor de un solo ratón, y la barra representa el peso del tumor de la media para cada grupo.

Los paneles A y B de la Figura 24 demuestran el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o cis-platino en tumores de xenoinjerto NCCIT consolidados en ratones atímicos. La figura muestra una comparación del cambio de la media del grupo de ensayo en el tamaño del tumor como porcentaje del cambio de control con vehículo de la media en el tamaño del tumor. Los ratones atímicos que portaban tumores testiculares humanos NCCIT consolidados fueron tratados con B3F6.1-DM4 a 25 (n=8) mg/kg iv una vez al día en el Día 15, B3F6.1-DM4 a 10 (n=8) mg/kg iv en el Día 15, 37 y 44^a, vehículo (n=16) iv q7dx3 y cis-platino (n=8) sc 2 mg/kg 3x/sem. x 6 comenzando el Día 15. El panel A indica los datos combinados de todos los ratones que recibieron una dosis de 10 mg/kg. El panel B indica los datos de los ratones (n=5) que recibieron una dosis de 10m/kg/inj en el Día 15 y 37 separados de los datos de los ratones (n=3) que recibieron la dosis de 10 mg/kg/inj en el Día 15,37 y 44. La barra horizontal representa los criterios del National Cancer Institute para actividad (42%).

^aEn el Día 44 solamente tres ratones, cuyos tumores demostraron un crecimiento progresivo, recibieron dosis de 10 mg/kg

Los paneles A y B de la Figura 25 muestran el peso corporal de la media de ratones atímicos que portaban tumores testiculares humanos NCCIT consolidados y que fueron tratados con B3F6.1-DM4 de longitud total a 25 (n=8) mg/kg iv una vez al día en el Día 15, B3F6.1-DM4 a 10 (n=8) mg/kg iv en el Día 15, 37 y 44^a, vehículo (n=16) iv q7dx3 y cis-platino (n=8) sc 2 mg/kg 3x/sem. x 6 comenzando en el Día 15. El panel A muestra los datos combinados de todos los ratones que recibieron dosis de 10 mg/kg. El panel B muestra los datos de los ratones (n=5) que recibieron dosis de 10 m/kg/inj en los Días 15 y 37 separados de los datos de los ratones (n=3) que recibieron dosis de 10 mg/kg/inj en los Días 15, 37 y 44.

^aEn el Día 44, solamente tres ratones, cuyos tumores demostraron un crecimiento progresivo, recibieron dosis de 10 mg/kg

La Figura 26 demuestra el efecto de B3F6.1-DM4 de longitud total a 10 (n=8) y 20 (n=8) mg/kg administrados iv en el Día 13, 17 y 21 (como lo indican las flechas), vehículo (n=16) administrado iv 3x/sem. x 4 comenzando el Día14, y Camptosar (n=8) 10 mg/kg administrado sc el Día 13-14, 17-21, 24-26, sobre el cambio en el peso del tumor de

tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados en ratones atímicos. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

La Figura 27 indica el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 sobre tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados en ratones atímicos. Los ratones fueron tratados con B3F6.1-DM4 a 10 (n=8) y 20 (n=8) mg/kg iv en el Día 13, 17 y 21, vehículo (n=16) iv 3x/sem. x 4 comenzando en el Día 14 y Camptosar (n=8) 10 mg/kg sc en el Día 13-14, 17-21, 24-26. Cada punto representa el peso del tumor de un solo ratón, y las barras representan el peso del tumor de la media para cada grupo.

La Figura 28 indica el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o Camptosar en tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados en ratones atímicos. La figura muestra una comparación de los tamaños de los tumores de la media en el grupo de ensayo como porcentaje del tamaño del tumor control con vehículo de la media. Los ratones atímicos que portaban los tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 a 10 (n=8) y 20 (n=8) mg/kg iv en el Día 13, 17 y 21, vehículo (n=16) iv 3x/sem. x 4 comenzando el Día 14 y Camptosar (n=8) 10 mg/kg sc en el Día 13-14, 17-21, 24-26. La barra indica los criterios del National Cancer Institute para actividad (42%).

La Figura 29 indica los pesos corporales de la media de ratones atímicos que portaban tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados y tratados con B3F6 de longitud total conjugado a DM4. Los ratones se trataron con B3F6.1-DM4 a 10 (n=8) y 20 (n=8) mg/kg iv en el Día 13, 17 y 21 (como lo indican las flechas), vehículo (n=16) IV 3x/sem. x 4 comenzando en el Día 14 y Camptosar (n=8) 10 mg/kg sc en el Día 13-14, 17-21, 24-26. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

La Figura 30 indica los efectos de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o Camptosar en tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados en ratones atímicos. B3F6.1-DM4 a 15 (n=8) y 30 (n=8) mg/kg se administró iv q7dx3 (como lo indican las flechas), el vehículo (n=16) se administró iv 3x/sem x 4 comenzando el Día 14, y Camptosar (n=8) 10 mg/kg se administró sc en el Día 13-14, 17-21, 24-26. Se muestra el cambio en el peso del tumor de tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

La Figura 31 indica el efecto de B3F6.1-DM4 de longitud total sobre tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados en ratones atímicos. Los ratones atímicos que portan tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 a 15 (n=8) y 30 (n=8) mg/kg iv q7dx3, vehículo (n=16) IV 3x/sem. x 4 comenzando el Día 14 y Camptosar (n=8) 10 mg/kg sc el Día 13-14, 17-21, 24-26. Cada punto representa el peso del tumor de un solo ratón, y las barras representan el peso del tumor de la media para cada grupo.

La Figura 32 indica el efecto de B3F6 de longitud total conjugado a DM4 o Camptosar sobre tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados en ratones. Los datos se exponen como una comparación de los tamaños de los tumores de la media del grupo de ensayo como un porcentaje del tamaño del tumor de control con vehículo de la media. Los ratones atímicos que portaban los tumores de xenoinjerto Calu-6 consolidados se trataron con B3F6.1-DM4 a 15 (n=8) y 30 (n=8) mg/kg iv q7dx3, vehículo (n=16) iv 3x/sem. x 4 comenzando el Día 14, y Camptosar (n=8) 10 mg/kg sc en el Día 13-14, 17-21, 24-26. La barra indica los criterios del National Cancer Institute para actividad (42%).

La Figura 33 indica pesos corporales de ratones atímicos que portaban tumores anaplásicos de pulmón humano Calu-6 consolidados y que se trataron con B3F6.1-DM4 de longitud total a 15 (n=8) y 30 (n=8) mg/kg iv q7dx3 (como lo indican las flechas), vehículo (n=16) iv 3x/sem. x 4 comenzando el Día 14 e irinotecán (n=8) 10 mg/kg sc el Día 13-14, 17-21, 24-26. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

40 Descripción detallada de la descripción

La descripción se basa, al menos en parte, en el desarrollo de anticuerpos anti-Cripto injertados con CDR y otros anticuerpos anti-Cripto humanizados. Más específicamente, estos anticuerpos derivan de anticuerpo de ratón B3F6. Como se describe en la presente memoria, se desarrollaron múltiples formas de anticuerpos anti-Cripto humanizados y se conjugaron a maitansoides para ensayos en modelos de células tumorales. Los resultados demuestran la utilidad de estos anticuerpos para la inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo*. Estos anticuerpos anti-Cripto humanizados son más adecuados que los anticuerpos de ratón para uso en sujetos humanos.

Se han preparado tanto los anticuerpos de longitud total humanizados como los anticuerpos humanizados que carecen de los dominios CH2. Típicamente, los anticuerpos que carecen del dominio CH2 recombinante producidos en cultivos celulares resultan en heterogeneidad de bisagra, lo que conduce a la presencia de dos formas del anticuerpo en disolución. En disoluciones no expuestas previamente, ambas formas están presentes como proteínas diméricas (donde cada monómero comprende una cadena pesada y una cadena ligera). Una molécula de inmunoglobulina que comprende un constructo de cuatro cadenas estables de aproximadamente 150-160 kDa en donde los dímeros se sostienen entre sí por un enlace disulfuro de la cadena pesada entre las cadenas (Forma A) y uno comprende una forma en la que los dímeros no están unidos mediante enlaces disulfuro entre cadenas (Forma.

B). La Forma B también forma un dímero estable bajo condiciones de no exposición previa, pero puede identificarse bajo condiciones desnaturizantes, no reductoras, en donde las cadenas pesadas se disocian, produciendo una molécula de 75-80 kDa. Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de purificación de afinidad MAb.

5 La frecuencia de aparición de la forma B en diversos isotipos de IgG intacta se debe, aunque sin limitarse a ello, a diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra de la molécula MAb. De hecho, una sola sustitución de aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la forma B (Angal et al. 1993. Molecular Immunology 30:105) hasta niveles típicamente observados usando una bisagra de IgG1 humana. No obstante, aplicar esta misma sustitución de aminoácidos a los anticuerpos
10 que carecen del dominio CH2 no elimina la Forma B de las preparaciones.

Como se describe en la presente memoria, la inclusión de ciertos péptidos conectores en las moléculas de unión a Cripto humanizada de la descripción resulta en la biosíntesis preferencial de los dímeros de polipéptido que se unen mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas o que no están unidos mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas.

15 Antes de describir en más detalle la descripción, para practicidad, ciertos términos se describen a continuación:

I. Definiciones

Las moléculas de unión de la descripción son moléculas de polipéptidos que comprenden por lo menos un dominio de unión que comprende un sitio de unión que se une específicamente a una molécula Cripto humana. Las secuencias ilustrativas de Cripto humana se indican en la SEQ ID NO: 6 (CR-1) y en la SEQ ID NO: 7 (CR-3). CR-1
20 corresponde al gen estructural que codifica la proteína Cripto humana expresada en las células de teratocarcinoma humanas no diferenciadas y CR-3 corresponde a una copia completa del mRNA que contiene siete sustituciones de bases en la región codificadora que representa tanto sustituciones silenciosas como de reemplazo. Mapas CR-1 al cromosoma 3, y mapas CR-3 a Xq21-q22. Dono et al. 1991. Am J Hum Genet. 1991 49:555.

Las moléculas de unión de la descripción comprenden por lo menos una CDR derivada del anticuerpo B3F6 murino. El anticuerpo B3F6 murino se une a un epítipo en el dominio que abarca los residuos de aminoácidos 46-62 de Cripto. El hibridoma que elabora el anticuerpo B3F6 murino (también denominado B3F6.17) se depositó con el núm.
25 de acceso en ATCC PTA-3319. El anticuerpo se preparó inmunizando ratones con una proteína de fusión Cripto expresada en células CHO. La proteína de fusión utilizada para inmunización comprendió los residuos de aminoácidos 1 a 169 de Cripto [aminoácidos 1-169 de la SEQ ID NO: 6], condensados a un dominio Fc de IgG₁ humana (el constructo denominado CR(del C)-Fc). Los métodos para elaborar el anticuerpo B3F6 se describen en más detalle, p. ej., en el documento WO 02/088170.
30

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "derivado de " una proteína designada se refiere al origen del polipéptido. En un ejemplo, el polipéptido o la secuencia de aminoácidos que deriva de un polipéptido de partida particular es una secuencia CDR o secuencia relacionada. En un ejemplo, la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de partida particular no es contigua. Por ejemplo, en un caso, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR
35 derivan de un anticuerpo de partida. En un ejemplo, el polipéptido o la secuencia de aminoácidos que deriva de un polipéptido de partida particular o la secuencia de aminoácidos tiene una secuencia de aminoácidos esencialmente idéntica a aquella de la secuencia de partida, o a una porción de la misma en donde la porción consiste en por lo menos 3-5 aminoácidos, 5-10 aminoácidos, por lo menos 10-20 aminoácidos, por lo menos 20-30 aminoácidos o por
40 lo menos 30-50 aminoácidos, o que es de otra forma identificable por un experto en la técnica por tener su origen en la secuencia de partida. En un ejemplo, la o las secuencias CDR derivadas del anticuerpo de partida se alteran para producir las secuencias CDR variantes, en donde las secuencias CDR variantes mantienen la actividad de unión a Cripto.

El experto en la técnica también ha de entender que las moléculas de unión de la descripción pueden modificarse de modo tal que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula B3F6 de la cual derivaron. Por ejemplo, se
45 pueden efectuar sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que conduzcan a sustituciones o cambios conservadores en residuos de aminoácidos "no esenciales" (p. ej., en residuos de marco y/o CDR). Las moléculas de unión de la descripción mantienen su capacidad de unión a Cripto.

Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia nucleotídica de la
50 inmunoglobulina, de modo tal que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse por técnicas convencionales tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se realizan en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es
55 aquella en la que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la

- técnica e incluyen cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofán), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptofán, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina puede reemplazarse con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral, en otro ejemplo, una cadena de aminoácidos puede reemplazarse con una cadena estructuralmente similar que difiera en orden y/o composición de los miembros de la familia de la cadena lateral.
- 5
- Alternativamente, en otro ejemplo, pueden introducirse mutaciones de forma aleatoria en todo o parte de la secuencia codificadora de inmunoglobulina.
- 10
- En un ejemplo, las moléculas de unión comprenden un sitio de unión. En otro ejemplo, las moléculas de unión comprenden por lo menos dos sitios de unión. En un ejemplo, las moléculas de unión comprenden dos sitios de unión. En un ejemplo, las moléculas de unión comprenden tres sitios de unión. En otro ejemplo, las moléculas de unión comprenden cuatro sitios de unión.
- 15
- En un ejemplo, las moléculas de unión de la descripción son monómeros. En otro ejemplo, las moléculas de unión de la descripción son multímeros. Por ejemplo, en un caso, las moléculas de unión de la descripción son dímeros. En un caso, los dímeros de la descripción son homodímeros, que comprenden dos subunidades monoméricas idénticas. En otro ejemplo, los dímeros de la descripción son heterodímeros, que comprenden dos subunidades monoméricas no idénticas. Las subunidades del dímero pueden comprender una o más cadenas de polipéptidos.
- 20
- Por ejemplo, en un caso, los dímeros comprenden por lo menos dos cadenas de polipéptidos. En un ejemplo, los dímeros comprenden dos cadenas de polipéptidos. En otro ejemplo, los dímeros comprenden cuatro cadenas de polipéptidos (p. ej., como en el caso de moléculas de anticuerpos).
- Las moléculas de unión preferidas de la descripción comprenden secuencias de aminoácidos de región constante y de marco derivadas de una secuencia de aminoácidos humana. No obstante, los polipéptidos de unión pueden comprender secuencias de regiones constantes y/o de marco derivadas de otras especies mamíferas. Por ejemplo, pueden incluirse una región de marco de primate (p. ej., primate no humano), una porción de cadena pesada y/o una porción bisagra en las moléculas de unión en cuestión. En un ejemplo, uno o más aminoácidos murinos pueden estar presentes en la región de marco de un polipéptido de unión, p. ej., una secuencia de aminoácidos de marco de primate humano o no humano puede comprender una o más retromutaciones de aminoácidos en las que está presente el correspondiente residuo de aminoácidos de murino. Las moléculas de unión preferidas de la descripción son menos inmunogénicas que el anticuerpo murino B3F6 de partida.
- 25
- 30
- Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende por lo menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (p. ej., región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o su variante o fragmento. En un ejemplo, un polipéptido de la descripción comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, por lo menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2. En otro ejemplo, un polipéptido de la descripción comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3. En otro ejemplo, un polipéptido de la descripción comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, por lo menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3. En otro caso, un polipéptido de la descripción comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH3. En un ejemplo, un polipéptido de la descripción carece de por lo menos una porción de un dominio CH2 (p. ej., todo o parte de un dominio CH2). En otro ejemplo, un polipéptido de la descripción comprende una cadena pesada de Ig completa. Como se expuso anteriormente, el experto en la técnica ha de entender que estos dominios (p. ej., las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de modo tal que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina natural.
- 35
- 40
- 45
- En un ejemplo, por lo menos dos de las cadenas de polipéptidos de una molécula de unión de la descripción comprenden por lo menos una porción de cadena pesada derivada de una molécula de inmunoglobulina o anticuerpo. En un ejemplo, por lo menos dos porciones de cadena pesada de un polipéptido de la descripción están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos e interactúan, p. ej., mediante por lo menos un enlace disulfuro (Forma A) o mediante interacciones no covalentes (Forma B) para formar un polipéptido dimérico, donde cada monómero del dímero comprende por lo menos una porción de cadena pesada.
- 50
- En un ejemplo, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptidos de un dímero son idénticas a aquellas de una segunda cadena de polipéptidos del dímero. En un ejemplo, los monómeros (o medio-monómeros) de un dímero de la descripción son idénticos unos a otros. En otro ejemplo, no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana distinto.
- 55
- En un ejemplo, un dímero de la descripción puede sostenerse unido por interacciones covalentes, p. ej., enlaces disulfuro. En un ejemplo, un dímero de la descripción puede mantenerse unido por uno o más enlaces disulfuro. En

otro ejemplo, un dímero de la descripción puede mantenerse unido por uno o más, preferiblemente dos enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido con uno o más, preferiblemente tres enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido con uno o más, preferiblemente cuatro enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido por uno o más, preferiblemente cinco enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido con uno o más, preferiblemente seis enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido con uno o más, preferiblemente siete enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido con uno o más, preferiblemente ocho enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido con uno o más, preferiblemente nueve enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción se mantiene unido con uno o más, preferiblemente diez enlaces disulfuro. En otro ejemplo, un dímero de la descripción no se mantiene unido por enlaces disulfuro, sino que se mantiene unido, p. ej., con interacciones no covalentes.

Las porciones de cadena pesada de un polipéptido pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferiblemente, la porción de cadena ligera comprende por lo menos un dominio VL o CL.

En un ejemplo, un polipéptido de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos no derivados de una molécula de Ig. Las modificaciones ilustrativas se describen en más detalle a continuación. Por ejemplo, en un caso, un polipéptido de la descripción puede comprender una secuencia enlazadora flexible. En otro ejemplo, un polipéptido puede modificarse para añadir uno o más restos funcionales (p. ej., PEG, un fármaco, un profármaco y/o una etiqueta detectable).

Una proteína "quimérica" comprende una primera secuencia de aminoácidos unida a una segunda secuencia de aminoácidos con la que no está unida por naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se unen en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero dispuestas en una nueva ordenación en el polipéptido de fusión. Puede crearse una proteína quimérica, por ejemplo, por síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones de péptidos se codifican en la relación deseada. Los polipéptidos quiméricos ilustrativos incluyen proteínas de fusión y la bisagra quimérica que conecta los péptidos de la descripción.

En un ejemplo, un polipéptido de unión de la descripción es una proteína de fusión. En un ejemplo, una proteína de fusión de la descripción es una molécula quimérica que comprende un dominio de unión (que comprende por lo menos un sitio de unión) y un dominio de dimerización (que comprende por lo menos una porción de cadena pesada). La porción de cadena pesada puede ser de cualquier inmunoglobulina, tal como IgG1, IgG2, IgG3, o los subtipos de IgG4 IgA, IgE, IgD o IgM. En un ejemplo, una proteína de fusión comprende además un péptido conector sintético.

En otro ejemplo de la descripción, una molécula de unión es una "quimera de anticuerpo-proteína de fusión". Dichas moléculas comprenden una molécula que combina por lo menos un dominio de unión de un anticuerpo con por lo menos una proteína de fusión. Preferiblemente, la interconexión entre los dos polipéptidos es un dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina.

El término "heterólogo" según se aplica a un polinucleótido o a un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido deriva de una entidad genotípicamente distinta de aquella del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido o antígeno heterólogo puede derivar de una especie distinta, de un tipo de célula distinto, o del mismo tipo de célula de distintas personas.

La expresión "dominio de unión al ligando" o "porción de unión al ligando", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier receptor natural (p.ej., receptor de superficie celular) o cualquiera de sus regiones o derivados que retenga por lo menos una capacidad cualitativa de unión al ligando, y preferiblemente la actividad biológica de un correspondiente receptor natural.

La expresión "dominio de unión al receptor" o "porción de unión al receptor", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier ligando natural o a cualquiera de sus regiones o derivados que retiene por lo menos una capacidad cualitativa de unión al receptor, y preferiblemente la actividad biológica de un correspondiente ligando natural.

En un ejemplo, las moléculas de unión de la descripción son moléculas de "anticuerpo" o "inmunoglobulina", p. ej., moléculas de anticuerpo o inmunoglobulina que ocurren naturalmente (su fragmento de unión al antígeno) o moléculas de anticuerpo genéticamente modificadas que se unen en un modo similar a las moléculas de anticuerpo. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "inmunoglobulina" incluye un polipéptido que tiene una combinación de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, ya sea que posea o no cualquier inmunorreactividad específica relevante. "Anticuerpos" se refiere a dichos ensamblajes que tienen actividad inmunorreactiva específica conocida e importante a un antígeno de interés (p. ej., un antígeno asociado a un tumor). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente entre cadenas. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas vertebrados se entienden relativamente bien.

Como se analizará en más detalle a continuación, el término genérico "inmunoglobulina" comprende cinco clases distintas de anticuerpo que pueden distinguirse bioquímicamente. Las cinco clases de anticuerpos están dentro del alcance de la presente descripción, el siguiente análisis se referirá en general a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a las inmunoglobulinas IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas de polipéptidos ligeras idénticas de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas por enlaces disulfuro en una configuración "Y" en la que las cadenas ligeras se juntan con las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y siguiendo a través de la región variable.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. En este sentido, se ha de apreciar que los dominios variables tanto de las porciones de cadena ligera (VL) como de cadena pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de los antígenos. A la inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión de complementos y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida se tornan más distales al sitio de unión al antígeno o al término amino del anticuerpo. El término N es una región variable y el término C es una región constante; los dominios CH3 y CL realmente comprenden el término carboxi de las cadenas pesada y ligera, respectivamente.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "residuos de aminoácidos de CDR de región variable" incluye aminoácidos en una CDR o región determinante de complementaridad según lo identificado usando los métodos basados en secuencia o estructura. Tal como se emplean en la presente memoria, "CDR" o "región determinante de complementaridad" significan los sitios de unión al antígeno no contiguos que se hallan dentro de la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977) y Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest (1991), y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y por MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) en donde las definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR según lo definido por cada una de las referencias anteriormente citadas se exponen para comparación. Preferiblemente, el término "CDR" es una CDR según lo define Kabat en base a las comparaciones de secuencias.

Definiciones de CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Kabat et al., *supra*

²La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Chothia et al., *supra*

La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de MacCallum et al., *supra*

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "residuos de aminoácidos de marco (FR) de región variable" se refiere a aquellos aminoácidos en la región de marco de una cadena de Ig. La expresión "región de

marco" o "región FR", tal como se emplea en la presente memoria, incluye los residuos de aminoácidos que son parte de la región variable, pero que no son parte de las CDR (p. ej., usando la definición de Kabat de las CDR). En consecuencia, un marco de región variable tiene entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud pero incluye solamente aquellos aminoácidos fuera de las CDR. Para el ejemplo específico de una región variable de cadena pesada y para las CDR según lo definido por Kabat et al., la región de marco 1 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 1-30; la región de marco 2 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 36-49; la región de marco 3 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 66-94 y la región de marco 4 corresponde al dominio de la región variable de los aminoácidos 103 al final de la región variable. Las regiones de marco para la cadena ligera están separadas de modo similar unas de otras por cada una de las CDR de región variable de la cadena ligera. De forma similar, usando la definición de las CDR de Chothia et al o de McCallum et al., los límites de la región de marco están separados por los respectivos términos de CDR como se describió anteriormente. En un ejemplo preferido, las CDR se definen por Kabat.

En anticuerpos naturales, las seis CDR presentes en cada anticuerpo monomérico son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que se posicionan específicamente para formar el sitio de unión al antígeno, ya que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los dominios variables de la cadena pesada y ligera exhiben menos variabilidad intermolecular en la secuencia de aminoácidos y se denominan regiones de marco. Las regiones de marco adoptan en gran medida una conformación de hoja β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de hoja β . Por consiguiente, estas regiones de marco actúan para formar un andamio que provee posicionamiento para las seis CDR en orientación correcta por interacciones no covalentes entre cadenas. El sitio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo al epítipo del antígeno inmunorreactivo. El experto en la técnica puede identificar fácilmente la posición de las CDR.

Como se indicó previamente, se conocen bien las estructuras subunitarias y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina. Tal como se emplea en la presente, la expresión "dominio VH" incluye el dominio variable aminoterminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y la expresión "dominio CH" incluye el primer dominio de región constante (el más aminoterminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y es aminoterminal a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, p. ej., desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo que usa esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración EU, Kabat EA et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* Bethesda, US Department of Health and Human Services, NHL 1991). El dominio CH2 es único en el sentido que no está cercanamente apareado a otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas en N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural, intacta. Está también documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo así que las regiones de unión al antígeno N-terminal se muevan de manera independiente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux et al. *J. Immunol.* 1998 161:4083).

Las cadenas ligeras se clasifican o bien como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse o bien con una cadena ligera kappa o una lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones "extremo" de las dos cadenas pesadas se unen una a la otra mediante enlaces disulfuro covalentes o no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, células B o células hospedantes genéticamente modificadas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos derivan de un término N en los extremos bifurcados de la configuración Y al término C en la parte inferior de cada cadena. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (p. ej., $\gamma 1$, $\gamma 4$). Es naturaleza de esta cadena que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgB, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), p. ej. IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, etc. se caracterizan bien y se conocen por conferir especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para el experto en la materia en vista de la presente descripción y, por consiguiente, se encuentran dentro del alcance de la presente descripción.

Como se indicó previamente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y una específicamente epítipos en antígenos. Es decir, el dominio V_L y el dominio V_H de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo

cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres regiones determinantes complementarias (CDR) en cada una de las cadenas V_H y V_L .

5 El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpos que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpos intacta o completa. La expresión "fragmento de unión al antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compite con un anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del cual derivaron) para la unión al antígeno (es decir, unión específica). Tal como se emplea en la presente memoria, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, por ejemplo, una cadena ligera de anticuerpo (V_L), una cadena pesada de anticuerpo (V_H), un anticuerpo monocatenario ($scFv$), un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv y un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (DAb). Los fragmentos pueden obtenerse, p. ej., mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa, o por medios recombinantes.

15 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "sitio de unión" comprende una región de un polipéptido que es responsable de unirse selectivamente a una molécula diana de interés (p. ej., un antígeno, ligando, receptor, sustrato o inhibidor). Los dominios de unión comprenden por lo menos un sitio de unión. Los dominios ilustrativos incluyen un dominio variable de anticuerpo, un dominio de unión al receptor de un ligando, un dominio de unión al ligando de un receptor o un dominio enzimático.

20 Tal como se emplea en esta memoria, el término "valencia" se refiere al número de sitios de unión diana potenciales en un polipéptido. Cada sitio de unión diana se une específicamente a una molécula diana o a un sitio específico en una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión diana, cada sitio de unión diana puede unirse específicamente a las mismas moléculas o moléculas distintas (p. ej., puede unirse a distintos ligandos o distintos antígenos o distintos epítopos en el mismo antígeno). Las moléculas de unión en cuestión tienen por lo menos un sitio de unión específico para una molécula Cripto humana.

25 El término "especificidad" se refiere a la capacidad de unirse específicamente (p. ej., inmunorreaccionar) con una diana determinada. Un polipéptido puede ser mono-específico y contener uno o más sitios de unión que se unan específicamente a una diana, o un polipéptido puede ser multi-específico y contener dos o más sitios de unión que se unan específicamente a la misma diana o a dianas diferentes.

30 En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción es específica para más de una diana. Por ejemplo, en un caso, una molécula de unión multi-específica de la descripción se une a Cripto y a una segunda molécula expresada en una célula tumoral. Los anticuerpos ilustrativos que comprenden sitios de unión a antígenos que se unen a antígenos expresados en células tumorales se conocen en la técnica, y una o más CDR de dichos anticuerpos pueden incluirse en una molécula de unión de la descripción. Los anticuerpos ilustrativos incluyen: 2B8, Lym 1, Lym 2, LL2, Her2, B1, MB1, BH3, B4, B72.3, 5E8 y 5E10. En un caso preferido, un polipéptido de la descripción es un anticuerpo C2B8 que se une a CD20. En otro ejemplo preferido, un polipéptido de la descripción es un anticuerpo CC49 que reconoce TAG72.

35 En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende un péptido conector. Los péptidos conectores de la descripción son sintéticos. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "sintético" con respecto a los polipéptidos incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que no es natural. Por ejemplo, los polipéptidos no naturales que son formas modificadas de polipéptidos naturales (p. ej., que comprenden una mutación tal como una adición, sustitución o eliminación) o que comprenden una primera secuencia de aminoácidos (que puede o no ser natural) que está unida en una secuencia lineal de aminoácidos a una segunda secuencia de aminoácidos (que puede o no ser natural) a la que no está unida por naturaleza.

40 Los péptidos conectores de la descripción conectan dos dominios (p. ej., un dominio de unión y un dominio de dimerización) de una molécula de unión de la descripción. Por ejemplo, los péptidos conectores conectan una porción de cadena pesada a un dominio de unión que comprende un sitio de unión. En un ejemplo, un péptido conector conecta dos dominios de la región constante de la cadena pesada, tales como los dominios CH1 y CH2; los dominios CH1 y CH3; los dominios bisagra y CH1; los dominios bisagra y CH3; los dominios VH y bisagra, o un dominio CH3 y un polipéptido no de inmunoglobulina) en una secuencia de aminoácidos lineal de una cadena de polipéptidos. Preferiblemente, dichos péptidos conectores proveen flexibilidad a la molécula de unión y facilitan la dimerización mediante enlaces disulfuro. En un ejemplo, los péptidos conectores de la descripción se utilizan para reemplazar uno o más dominios de la cadena pesada (p. ej., por lo menos una porción de un dominio de la región constante (p. ej., por lo menos una porción de un dominio CH2) y/o por lo menos una porción de la región bisagra (p. ej., por lo menos una porción del dominio de la región bisagra inferior) en un constructo que carece de dominio). Por ejemplo, en un caso, un dominio VH se condensa a un dominio CH3 mediante un péptido conector (el término C del péptido conector está unido al término N del dominio CH3 y el término N del péptido conector está unido al término C del dominio VH). En otro ejemplo, un dominio VL está condensado a un dominio CH3 mediante un péptido conector (el término C del péptido conector está unido al término N del dominio CH3 y el término N del péptido conector está

unido al término C del dominio VL. En otro ejemplo, un dominio CH1 está condensado a un dominio CH3 mediante un péptido conector (el término C del péptido conector está unido al término N del dominio CH3 y el término N del péptido conector está unido al término C del dominio CH1).

5 En un ejemplo, un péptido conector sintético comprende una porción de un dominio de la región constante. Por ejemplo, en un caso, un péptido conector que reemplaza al dominio CH2 puede comprender una porción del dominio CH2.

10 En un ejemplo, un péptido conector comprende o consiste en un enlazador gly-ser. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "enlazador gly-ser" se refiere a un péptido que consiste en residuos glicina y serina. Un enlazador gly/ser ilustrativo comprende la secuencia de aminoácidos GGGSSGGGSG (SEQ ID NO:8). En un ejemplo, un péptido conector de la descripción comprende por lo menos una porción de una región bisagra superior (p. ej., derivada de una molécula de IgG1, IgG3 o IgG4), por lo menos una porción de una región bisagra media (p. ej., derivada de una molécula IgG1, IgG3 o IgG4) y una serie de residuos de aminoácidos gly/ser (p. ej., un enlazador gly/ser tal como GGGSSGGGSG (SEQ ID NO:8)). En un ejemplo, el péptido conector comprende una sustitución de uno o más aminoácidos según lo comparado con las regiones bisagra naturales IgG1 o IgG3. En otro ejemplo, un péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos tal como aquella descrita en el documento WO 02/060955. Los péptidos conectores se describen en más detalle a continuación.

20 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "enlace disulfuro" incluye la unión covalente formada entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En las moléculas de IgG más naturales, las regiones CH1 y CL están enlazadas mediante un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están enlazadas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU).

25 En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende un sitio de unión a anticuerpos. Por ejemplo, en un caso, una molécula de unión de la descripción es una molécula de anticuerpos de longitud total. En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción es un fragmento de una molécula de anticuerpo. En otro ejemplo, la molécula de unión de la descripción es una molécula de anticuerpo modificada o sintética.

30 Las moléculas de unión de la descripción pueden prepararse usando técnicas conocidas en la industria. En un ejemplo, los polipéptidos de la descripción son moléculas de anticuerpos que han sido "recombinantemente producidas", es decir, se producen usando tecnología de DNA recombinante. Las técnicas ilustrativas para elaborar moléculas de anticuerpos se analizan en más detalle a continuación.

35 En un ejemplo, los polipéptidos de la descripción son anticuerpos modificados. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "anticuerpo modificado" incluye formas sintéticas de anticuerpos que se alteran de manera tal que no ocurren naturalmente, p. ej., anticuerpos que comprenden por lo menos dos porciones de cadena pesada pero no dos porciones de cadena pesada completas (como anticuerpos o minicuerpos que carecen de dominio); formas multiespecíficas de anticuerpos (p. ej., biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para unirse a dos o más antígenos diferentes o epítomos diferentes en un solo antígeno); moléculas de cadena pesada unidas a moléculas scFv y similares. Las moléculas ScFv se conocen en la técnica y se describen, p. ej., en la patente estadounidense 5.392.019. Además, la expresión "anticuerpo modificado" incluye formas multivalentes de anticuerpos (p. ej., trivalentes, tetravalentes, etc., anticuerpos que se unen a tres o más copias del mismo antígeno). En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción es una proteína de fusión que comprende por lo menos una porción de cadena pesada que carece de un dominio CH2 y que comprende un dominio de unión de un polipéptido que comprende la porción de unión de un miembro de un par de ligandos receptores.

45 En un ejemplo, la expresión "anticuerpo modificado" de acuerdo con la presente descripción incluyen inmunoglobulinas, anticuerpos o fragmentos inmunorreactivos o sus combinaciones, en donde por lo menos una fracción de uno o más dominios de región constante se ha eliminado o alterado de alguna forma como para proporcionar las características bioquímicas deseadas, como la capacidad de dimerizarse de manera no covalente, mayor capacidad de localizarse en el sitio de un tumor o menor semivida en suero en comparación con un anticuerpo entero, inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. En un ejemplo preferido, los polipéptidos de la presente descripción son anticuerpos que carecen de dominio que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de por lo menos una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. Más preferiblemente, un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado se eliminará e incluso más preferiblemente se eliminará todo o parte del dominio CH2.

En un ejemplo preferido, un polipéptido de la descripción no producirá una respuesta inmunitaria perjudicial en un ser humano.

55 En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una región constante, p. ej., una región constante de la cadena pesada, que está modificada en comparación con una región constante de tipo natural. Es

decir, los polipéptidos de la descripción pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio de la región constante de la cadena ligera (CL). Las modificaciones ilustrativas incluyen adiciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios.

5 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "tumor maligno" se refiere a un tumor no benigno o a un cáncer. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "cáncer" incluye un tumor maligno caracterizado por el crecimiento celular desregulado o descontrolado. Los tipos de cáncer ilustrativos incluyen: carcinomas, sarcomas, leucomas y linfomas. El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios (p. ej., aquellos cuyas células no han migrado a sitios del cuerpo del sujeto distintos del sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (p. ej., aquellos que surgen de metástasis, la migración de las células tumorales a sitios secundarios que son distintos del sitio del tumor original).

10 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "medio que separa polipéptidos en base a la interacción hidrófoba" incluye un medio que comprende ligandos hidrófobos (p. ej., grupos alquilo o arilo) covalentemente unidos a una matriz. Dicho medio puede usarse para separar polipéptidos en base a la interacción entre un disolvente y grupos no polares accesibles en la superficie de los polipéptidos y los ligandos hidrófobos del medio. Un medio ilustrativo es Phenyl 5PW-HR disponible de Tosoh Bioscience.

15 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "conductividad" incluye conductividad eléctrica de una disolución medida en microSiemens/cm (antes micromhos/cm). Cuanto mayor sea el contenido de iones de una disolución, mayor será la conductividad de la disolución. La conductividad puede medirse fácilmente usando técnicas conocidas en la industria (p. ej., midiendo la corriente que pasa entre dos electrodos).

20 Los métodos de separación de la descripción pueden emplearse con disoluciones que tienen un pH en el intervalo de ácido a neutro, p. ej., entre aproximadamente pH 3,5 y aproximadamente neutro. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "pH aproximadamente neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7. Por ejemplo, en un caso, un método de separación de la descripción puede llevarse a cabo usando una disolución (p. ej., un tampón) que tenga un pH de aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o aproximadamente 8. Preferiblemente, el pH de la disolución es de aproximadamente 6 o aproximadamente 7. En un ejemplo, el pH de la disolución es de aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9 o aproximadamente 8,0.

25 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "matriz de afinidad" incluye una matriz, tal como agarosa, vidrio de poro controlado o poli (estirenodivinilo) benceno al que se une un ligando de afinidad. El ligando de afinidad se une al polipéptido deseado y los polipéptidos contaminantes no se unen al ligando de afinidad. El polipéptido deseado puede eluirse de la matriz de afinidad usando protocolos conocidos.

30 Tal como se emplea en la presente memoria, "genéticamente modificado" incluye manipulación de moléculas de ácido nucleico o polipéptido por medios sintéticos (p. ej., técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, acoplamiento enzimático o químico de péptidos, o alguna combinación de estas técnicas). Preferiblemente, las moléculas de unión de la descripción son genéticamente modificadas, p. ej., para expresar un péptido conector de la descripción.

35 Tal como se emplean en esta memoria, los términos "unido," "condensado" o "fusión" se utilizan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier medio, incluida la conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión de marco de lectura abierto" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) para formar un ORF continuo más largo, en un modo que mantenga el correcto marco de lectura de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una proteína sencilla que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (en donde los segmentos normalmente no están unidos por naturaleza). Si bien el marco de lectura se hace así continuo en los segmentos condensados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente, por ejemplo, por una secuencia enlazadora de un marco de lectura.

40 Tal como se emplean en esta memoria, los términos "unido," "condensado" o "fusión" se utilizan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier medio, incluida la conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión de marco de lectura abierto" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) para formar un ORF continuo más largo, en un modo que mantenga el correcto marco de lectura de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una proteína sencilla que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (en donde los segmentos normalmente no están unidos por naturaleza). Si bien el marco de lectura se hace así continuo en los segmentos condensados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente, por ejemplo, por una secuencia enlazadora de un marco de lectura.

45 Tal como se emplean en esta memoria, los términos "unido," "condensado" o "fusión" se utilizan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier medio, incluida la conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión de marco de lectura abierto" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) para formar un ORF continuo más largo, en un modo que mantenga el correcto marco de lectura de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una proteína sencilla que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (en donde los segmentos normalmente no están unidos por naturaleza). Si bien el marco de lectura se hace así continuo en los segmentos condensados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente, por ejemplo, por una secuencia enlazadora de un marco de lectura.

50 Tal como se emplean en esta memoria, los términos "unido," "condensado" o "fusión" se utilizan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier medio, incluida la conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión de marco de lectura abierto" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) para formar un ORF continuo más largo, en un modo que mantenga el correcto marco de lectura de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una proteína sencilla que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (en donde los segmentos normalmente no están unidos por naturaleza). Si bien el marco de lectura se hace así continuo en los segmentos condensados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente, por ejemplo, por una secuencia enlazadora de un marco de lectura.

55 En el contexto de polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en dirección amino a carboxilo terminal en la que los residuos que lindan unos con otros en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "sujeto que se beneficiaría con la administración de una molécula de unión" incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían con la administración de una molécula de unión utilizada, p. ej., para detección de un antígeno reconocido por una molécula de unión (p. ej., para un procedimiento de diagnóstico) y/o con el tratamiento con una molécula de unión para reducir o eliminar la diana reconocida por la molécula de unión. Por ejemplo, en un caso, el sujeto puede beneficiarse con la reducción o eliminación de una molécula soluble o particulada de la circulación o el suero (p. ej., una toxina o un patógeno) o con la reducción o eliminación de una población de células que expresan la diana p. ej., células tumorales). Como se describe en más detalle en la presente memoria, la molécula de unión puede utilizarse en forma no conjugada o puede conjugarse, p. ej., a un fármaco, profármaco o isótopo.

10 II. Humanización

En un ejemplo, las moléculas de unión de la descripción comprenden o derivan de por lo menos una región variable de un anticuerpo B3F6 humanizado, p. ej., una región variable de la cadena ligera o de la cadena pesada.

15 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende por lo menos una cadena que comprende residuos de marco de la región variable de una cadena de anticuerpo humano (denominado "anticuerpo aceptor ") y por lo menos una región determinante de complementariedad ("CDR") sustancialmente de un anticuerpo no humano, (denominado "anticuerpo donante"). La región o regiones constantes, si están presentes, también son práctica o totalmente de una inmunoglobulina humana.

Las CDR de B3F6 murino se exponen a continuación en la Tabla 1:

TABLA 1: Secuencias CDR de B3F6 (Definición de Kabat)

CDR L1	RSSQSIVHSNGNTYLE	SEQ ID NO: 9
CDR L2	KVSNRFS	SEQ ID NO. 10
CDR L3	FQGSHVPLT	SEQ ID NO: 11
CDR HI	SYWIH	SEQ ID NO: 12
CDR H2	ENDSNGRTNYNEKFKN	SEQ ID NO: 13
CDR H3	GPNYFYSDY	SEQ ID NO: 14

20 En un ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la descripción comprende por lo menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo B3F6. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la descripción comprende por lo menos dos CDR de una molécula de anticuerpo B3F6. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la descripción comprende por lo menos tres CDR de una molécula de anticuerpo B3F6. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la descripción comprende por lo menos cuatro CDR de una molécula de anticuerpo B3F6. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno comprende por lo menos cinco CDR de una molécula de anticuerpo B3F6. En otro ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la descripción comprende por lo menos seis CDR de una molécula de anticuerpo B3F6. En un ejemplo, la por lo menos una CDR (o por lo menos una CDR de la mayor de una de las CDR de B3F6 que están presentes en la molécula de unión) se modifica para variar en secuencia de la CDR de una molécula B3F6 natural, incluso así, retiene la capacidad de unirse a B3F6.

35 Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando tecnología de DNA recombinante, véase por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA., (1989), 86:10029-10033; Jones et al., Nature, (1986), 321:522-25; Riechmann et al, Nature, (1988), 332:323-27; Verhoeyen et al, Science, (1988), 239:1534-36; Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86:3833-37; patentes de Estados Unidos núm. US 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370.

40 Cuando un anticuerpo donante no humano preferido se ha seleccionado para humanización, puede obtenerse un anticuerpo aceptor humano apropiado, p. ej., a partir de las bases de datos de las secuencias de genes de anticuerpo humano expresado, a partir de las secuencias Ig de línea germinal o de una secuencia de consenso de varios anticuerpos humanos. La sustitución de las CDR no humanas en un marco de dominio variable humano es más probable que resulte en la retención de su orientación espacial correcta si el marco de dominio variable humano adopta la misma conformación o una similar al marco variable no humano del que se originan las CDR. Esto se logra obteniendo los dominios variables humanos de anticuerpos aceptores humanos cuyas secuencias de marco exhiben un alto grado de identidad de secuencias con los dominios de marco variables no humanos de los que derivaron las CDR. Las regiones de marco variables de las cadenas pesada y ligera pueden derivar de las mismas secuencias de anticuerpos humanas o de otras distintas. Preferiblemente, el anticuerpo aceptor humano retiene los residuos canónicos y de interconexión del anticuerpo donante. Además, el anticuerpo aceptor humano preferiblemente tiene

una similitud sustancial en la longitud de los bucles de la CDR. Véanse Kettleborough et al, *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger et al., *Protein Engineering* 6:971 (1993) y Carter et al, documento WO 92/22653.

Habiendo identificado las CDR del anticuerpo donante y del anticuerpo aceptor humano apropiado, la siguiente etapa es determinar cuál de los residuos, si lo hubiese, de estos componentes debe sustituirse para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. Típicamente, algunos o todos los aminoácidos de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina donante no humana que se requieren para la unión al antígeno (p. ej., una o más CDR) se usan para sustituir los correspondientes aminoácidos de la cadena ligera o pesada del anticuerpo aceptor humano. El anticuerpo aceptor humano retiene algunos o todos los aminoácidos que no se requieren para la unión al antígeno. En general, la sustitución de los residuos de aminoácidos humanos por murinos debe minimizarse, ya que la introducción de residuos murinos aumenta el riesgo de que el anticuerpo produzca una respuesta de anticuerpo antirratón humano (HAMA) en seres humanos. Pueden utilizarse métodos reconocidos en la técnica para determinar la respuesta inmunitaria con el fin de vigilar una respuesta HAMA en un paciente en particular o durante los ensayos clínicos. A los pacientes a los que se les administran anticuerpos humanizados se les puede practicar una evaluación de inmunogenicidad al comienzo y durante la administración de dicha terapia. La respuesta HAMA se mide, por ejemplo, detectando los anticuerpos al reactivo terapéutico humanizado, en muestras de suero del paciente usando un método conocido en la técnica, incluida la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (BIACORE) y/o el análisis ELISA de fase sólida.

Si es necesario, uno o más residuos en las regiones marco humanas pueden cambiarse a residuos en las correspondientes posiciones en el anticuerpo murino como para conservar la afinidad de unión del anticuerpo humanizado al antígeno. Este cambio algunas veces se denomina "retromutación". Ciertos aminoácidos de los residuos de marco de región variable humanos se seleccionan para retromutación en base a su posible influencia sobre la conformación de la CDR y/o la unión al antígeno. La disposición de las regiones CDR de murino con región de marco variable humana puede provocar restricciones conformacionales que, a menos que se corrijan con sustitución de ciertos residuos de aminoácidos, conducen a pérdida de afinidad de unión.

En un ejemplo, la selección de residuos de aminoácidos para retromutación puede determinarse, en parte, por modelado de ordenador, usando técnicas reconocidas en la industria. En general, los modelos moleculares se producen comenzando por estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o sus dominios. Las cadenas que se han de modelar se comparan para similitud de secuencia de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas (p. ej., estructuras de rayos X) y las cadenas o dominios que muestran la mayor similitud de secuencias se seleccionan como puntos de partida para construcción del modelo molecular. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios de inmunoglobulina que se estén modelando, y aquellos en la estructura de partida. Las estructuras modificadas se ensamblan luego en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina por minimización de energía y verificando que todos los átomos estén dentro de distancias apropiadas unos de otros y que las longitudes y ángulos de las uniones estén dentro de límites químicamente aceptables.

En otro ejemplo, se puede usar un planteamiento basado en los conocimientos o en los análisis de las bases de datos para humanización. Por ejemplo, dicha estrategia de humanización puede basarse en la inspección visual y el análisis de las secuencias de la región V de acuerdo con los métodos descritos en Rosok et al (Rosok MJ, et al., 1996. *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618). Se identifican los determinantes canónicos, los residuos superficiales y los residuos de contacto potenciales. Los residuos de contacto potenciales se observan y se clasifican en general de acuerdo con la definición estructural de bucles de CDR según lo definido por Chothia et al. (Chothia C y Lesk AM. 1987. *J. Mol. Biol.* 196: 901-917), hipervariabilidad de secuencias según lo definido por Kabat et al. (Rabat EA, Wu TT, Reid-Miller M, Parry HM y Gottesman KS. 1987. *Sequences of Protein of Immunological Interest*, U.S. department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, MD), y residuos de contacto de antígenos potenciales según lo definido por MacCallum et al. (MacCallum RM, Martin ACR, y Thorton JM. 1996. *J. Mol. Biol.* 262:732-745). Los bucles de CDR de murino, de acuerdo con la numeración y definición de Kabat, se injertan en su totalidad en el marco humano aceptor. Los residuos de relleno según lo definido por Padlan (Padlan EA. 1991. *Mol Immunol.* 28:489-498) se identifican, y se intenta conservar los residuos de relleno de acuerdo con la estrategia descrita en Singer et al. (Singer II et al. 1993. *J. Immunol.* 150:2844-2857). A cada residuo en la secuencia de marco humana se le asigna una "posición de riesgo" baja, media o alta para humanización de anticuerpos según lo descrito en Harris and Bajorath (Harris L y Bajorath J. 1995. *Protein Science* 4: 306-310).

En general las posiciones de bajo riesgo se mantienen humanas. Para muchas de las posiciones de aminoácidos de riesgo medio y alto no idénticas se puede hacer referencia a las colecciones privadas o públicas de secuencias de anticuerpos humanizados. En la revisión de secuencias de anticuerpos previamente humanizadas, se observó si la inclusión de un residuo de aminoácidos humano o murino (retromutación) resultó en la actividad de unión funcional o no. En aquellos casos en los que se considera una sustitución, se puede hacer referencia a un mapa de sustitución de aminoácidos (D, Bordo y P. Argos, 1991. *J. Mol. Biol.* 217:721-729) para confirmar la posibilidad de intercambio funcional de los residuos.

La selección de los residuos de aminoácidos para sustitución puede también determinarse, en parte, por
 5 examinación de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, o por observación empírica de
 los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere
 entre un residuo de región variable no humano y un residuo de marco de región variable humano, el aminoácido de
 marco humano usualmente debe sustituirse con el aminoácido de marco equivalente del anticuerpo donante no
 humano cuando el aminoácido del anticuerpo donante es un residuo canónico, un residuo de relleno de
 interconexión o un residuo inusual o excepcional que está próximo al sitio de unión.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende además por lo menos una retromutación de un
 10 residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón, donde el residuo de aminoácido
 es un residuo de relleno de interconexión. "Residuos de relleno de interconexión " incluye aquellos residuos en la
 interconexión entre VL y VH según lo definen, por ejemplo, Novotny y Eaber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66
 (1985).

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende por lo menos una retromutación de un residuo
 15 de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón que es un residuo canónico. Los
 "residuos canónicos " son residuos de marco conservados dentro de una clase canónica o estructural que se sabe
 que es importante para la conformación de la CDR (Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990). Los residuos
 canónicos incluyen 2, 25, 27B, 28, 29, 30, 33, 48, 51, 52, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y los residuos 24,
 26, 27, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Pueden identificarse residuos adicionales (p. ej., residuos
 20 determinantes de la estructura de la CDR) de acuerdo con la metodología de Martin y Thorton (1996) J. Mol. Biol
 263:800.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende además por lo menos una retromutación de un
 residuo de aminoácidos humano al correspondiente residuo de aminoácidos de ratón en donde el residuo de
 25 aminoácidos está en una posición capaz de interactuar con una CDR. Notablemente, se sabe que los aminoácidos
 en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo
 con Kabat) son capaces de interactuar con las CDR en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35
 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también son propensos a interactuar con las CDR.

Las técnicas ilustrativas para selección de residuos de marco para sustitución se exponen, por ejemplo, en la
 30 patente de Estados Unidos 5.585.089. En esa patente, se describen varias categorías de aminoácidos de marco
 humanos que pueden alterarse. En un ejemplo, un aminoácido de la categoría 2 se retromuta al correspondiente
 residuo murino. Específicamente, la categoría de 2 aminoácidos son aminoácidos en el marco de la inmunoglobulina
 aceptora humana que son inusuales (es decir, "raros", que tal como se emplea aquí indica un aminoácido que ocurre
 en esa posición en menos de 20%, pero por lo general menos de aproximadamente 10% de las secuencias de la
 35 región V de la cadena pesada (respectivamente) humana en un banco de datos representativo), y si el aminoácido
 del donante en esa posición es típico para secuencias humanas (es decir,, "común", que como se emplea aquí
 indica un aminoácido que ocurre más de aproximadamente 25%, pero usualmente más de aproximadamente 50%
 de las secuencias en un banco de datos representativo), entonces puede seleccionarse el aminoácido donante no
 humano (p. ej., aminoácido murino) en lugar del aminoácido aceptor humano. Este criterio ayuda a asegurar que un
 40 aminoácido atípico en el marco humano no rompa la estructura del anticuerpo. Además, reemplazando un
 aminoácido inusual con un aminoácido del anticuerpo donante que ocurre como típico para anticuerpos humanos, el
 anticuerpo humanizado puede hacerse menos inmunogénico.

Todas las secuencias de la región variable de la cadena ligera y la cadena pesada humanas se agrupan
 45 respectivamente en "subgrupos" de secuencias que son específicamente homólogas entre sí y tienen los mismos
 aminoácidos en determinadas posiciones críticas (Kabat et al., op. cit.). Al decidir si un aminoácido en la secuencia
 aceptora humana es "raro" o "común" entre secuencias humanas, con frecuencia será preferible considerar
 solamente aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo que la secuencia aceptora.

En un ejemplo, un aminoácido de categoría de 3 se retromuta al correspondiente residuo murino. Los residuos de la
 50 categoría 3 son adyacentes a una o más de las 3 CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina
 humanizada, pueden seleccionarse uno o más aminoácidos donantes en lugar del aminoácido aceptor. Estos
 aminoácidos son particularmente propensos a interactuar con los aminoácidos en las CDR y, si se escogen del
 aceptor, a distorsionar las CDR del donante y reducir la afinidad. Asimismo, los aminoácidos adyacentes pueden
 interactuar directamente con el antígeno (Amit et al., Science, 233, 747-753 (1986)) y seleccionar estos aminoácidos
 donantes puede ser conveniente para mantener todos los contactos de antígenos que proveen afinidad en el
 anticuerpo original.

En un ejemplo, un aminoácido de categoría 4 se retromuta al correspondiente residuo murino. Los aminoácidos de
 55 categoría 4 son aquellos que en el modelo tridimensional, típicamente el anticuerpo donante original, demuestran
 que ciertos aminoácidos fuera de las CDR están próximos a las CDR y tienen buena probabilidad de interactuar con
 los aminoácidos en las CDR por enlace de hidrógeno, fuerzas Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En esas
 posiciones de aminoácidos, puede seleccionarse el aminoácido de inmunoglobulina donante en lugar del aminoácido

de inmunoglobulina aceptor. Los aminoácidos de acuerdo con este criterio en general tendrán un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3 unidades angstrom de algún átomo en las CDR, y deben contener un átomo que podría interactuar con los átomos de la CDR de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, tales como aquellas ya mencionadas.

- 5 En el caso de átomos que pueden formar un enlace de hidrógeno, los 3 angstroms se miden entre sus núcleos, pero para átomos que no forman un enlace, los 3 angstroms se miden entre sus superficies Van der Waals. En consecuencia, en este último caso, los núcleos de estar dentro de aproximadamente 6 angstroms (3+suma de radios Van der Waals) para que los átomos se consideren capaces de interactuar. En muchos casos, los núcleos tendrán una separación de 4 o 5 a 6 Å. Para determinar si un aminoácido puede interactuar o no con las CDR, se prefiere no
10 considerar los últimos 8 aminoácidos de la CDR de cadena pesada CDR 2 como parte de las CDR, ya que desde el punto de vista de la estructura, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte del marco.

- Los aminoácidos en el marco que son capaces de interactuar con los aminoácidos en las CDR, y que por lo tanto pertenecen a la Categoría 4, pueden distinguirse de otra manera. El área de superficie accesible a disolvente de cada aminoácido de marco se calcula de dos maneras: (1) en el anticuerpo intacto, y (2) en una molécula hipotética
15 que consiste en el anticuerpo con sus CDR eliminadas. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 angstroms cuadrados o más demuestra que el acceso del aminoácido de marco al disolvente está al menos parcialmente bloqueado por las CDR, y por lo tanto que el aminoácido está haciendo contacto con las CDR. El área superficial accesible al disolvente de un aminoácido puede calcularse en base al modelo tridimensional de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos en la técnica (p. ej., Connolly, J. Appl. Cryst 16,548 (1983) y Lee and
20 Richards, J. Mol. Biol. 55,379 (1971)). Los aminoácidos de marco pueden también interactuar ocasionalmente con las CDR indirectamente, afectando la conformación de otro aminoácido de marco que a su vez contacta las CDR.

- Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en el marco son capaces de interactuar con las CDR en muchos anticuerpos (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196,901 (1987), Chothia et al, Nature 342,877 (1989), y Tramontano et al.,
25 J. Mol. Biol. 215,175 (1990), notablemente en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat, op. cit.), y por lo tanto estos aminoácidos en general estarán en la Categoría 4. Típicamente, las inmunoglobulinas humanizadas de la presente descripción incluirán aminoácidos donantes (si son distintos) en la categoría 4 además de éstos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también son propensos a interactuar con las CDR. Por consiguiente, en un ejemplo, uno o más aminoácidos donantes en lugar del aminoácido aceptor (cuando difieren) pueden incluirse en
30 una inmunoglobulina humanizada. Por otra parte, ciertas posiciones que pueden estar en la Categoría 4 tales como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera pueden algunas veces elegirse de la inmunoglobulina aceptor sin pérdida de la afinidad en la inmunoglobulina humanizada.

- Además de las categorías anteriormente mencionadas que describen cuándo un aminoácido en la inmunoglobulina humanizada puede tomarse del donante, ciertos aminoácidos en la inmunoglobulina humanizada pueden tomarse ni
35 del donante ni del aceptor, si yacen en la Categoría 5. Si el aminoácido en una posición determinada en la inmunoglobulina del donante es "raro" para secuencias humanas, y el aminoácido en esa posición en la inmunoglobulina aceptor también es "raro" para secuencias humanas, según se definió previamente, entonces el aminoácido en esa posición en la inmunoglobulina humanizada puede escogerse para ser algún aminoácido "típico" de secuencias humanas. Una opción preferida es el aminoácido que ocurre con más frecuencia en esa posición en
40 las secuencias humanas conocidas que pertenecen al mismo subgrupo que la secuencia aceptor.

- En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende tres CDR de cadena ligera B3F6 (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y una región de marco de cadena ligera humana. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende además por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en por lo menos una posición seleccionada del grupo que consiste
45 en: 2 y 100. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende además una retromutación de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 2 y 100. En otro ejemplo, la molécula de unión comprende retromutaciones en las posiciones 2 y 100 de la cadena ligera B3F6 humanizada. En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una retromutación en la posición 2 de la cadena ligera B3F6 humanizada y por lo menos una retromutación
50 adicional. En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una retromutación en la posición 100 de la cadena ligera B3F6 humanizada y por lo menos una retromutación adicional.

- En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende tres CDR de cadena pesada B3F6 (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y una región de marco de cadena pesada humana. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido humano al correspondiente
55 residuo de aminoácido de ratón en por lo menos una posición seleccionada del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una retromutación de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en la posición seleccionada del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción

comprende dos retromutaciones de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en las dos posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende tres retromutaciones de un residuo de aminoácido al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en las tres posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende cuatro retromutaciones de un residuo de aminoácido al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende cinco retromutaciones de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en cinco posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende seis retromutaciones de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en seis posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende siete retromutaciones de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en las siete posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende además retromutaciones de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en ocho posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende nueve retromutaciones de un residuo de aminoácido humano al correspondiente residuo de aminoácido de ratón en nueve posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 48, 67, 71, 73, 81, 82b, 93 y 112.

En un ejemplo, la descripción pertenece a las regiones variables humanizadas del anticuerpo B3F6 y a los polipéptidos que comprenden dichas regiones variables humanizadas.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera injertada a la CDR que se muestra en los aminoácidos 1-112 de la SEQ ID NO: 52. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera injertada a la CDR que se muestra en los aminoácidos 1-121 de la SEQ ID NO: 55.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de la región variable de la versión 1 de la cadena ligera que se muestra en la SEQ ID NO: 47. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de la región variable de la versión 1 de la cadena pesada que se muestra en la SEQ ID NO: 48. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de la región variable de la versión 2 de la cadena pesada que se muestra en la SEQ ID NO: 49.

En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de la región variable de la versión 2 de la cadena ligera que se muestra en la SEQ ID NO: 50. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de la región variable de la versión 3 de la cadena pesada que se muestra en la SEQ ID NO: 51.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena ligera injertada a la CDR en la SEQ ID NO: 52. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena ligera de la versión 1 que se muestra en la SEQ ID NO: 53. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena ligera de la versión 2 que se muestra en la SEQ ID NO: 54.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada injertada a la CDR que se muestra en la SEQ ID NO: 55. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada de la versión 1 que se muestra en la SEQ ID NO: 56.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada de la versión 2 que se muestra en la SEQ ID NO: 57. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada de la versión 3 que se muestra en la SEQ ID NO: 58.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada que carece del dominio injertado a la CDR que se muestra en la SEQ ID NO: 59. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada que carece del dominio de la versión 1 que se muestra en la SEQ ID NO: 60. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada que carece del dominio de la versión 2 que se muestra en la SEQ ID NO: 61. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una cadena pesada que carece del dominio de la versión 3 que se muestra en la SEQ ID NO: 62.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de cadena ligera injertada a la CDR que se muestra en la SEC NÚM. 63, que incluye una secuencia de señal opcional. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de cadena ligera de la versión 1 que se muestra en la SEQ ID NO: 64, que incluye una secuencia de señal opcional. En un ejemplo, una molécula de unión de la

descripción comprende una secuencia de cadena ligera de la versión 2 que se muestra en la SEQ ID NO: 65, que incluye una secuencia de señal opcional.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de cadena pesada injertada a la CDR que se muestra en la SEQ ID NO: 66, que incluye una secuencia de señal opcional. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de cadena pesada de la versión 1 que se muestra en la SEQ ID NO: 67, que incluye una secuencia de señal opcional. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de cadena pesada de la versión 2 que se muestra en la SEQ ID NO: 68, que incluye una secuencia de señal opcional. En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende una secuencia de cadena pesada de la versión 3 que se muestra en la SEQ ID NO: 69, que incluye una secuencia de señal opcional.

En un ejemplo, una cadena ligera que comprende las CDR B3F6 de murino y regiones de marco humanas se combina con una cadena pesada que comprende las CDR B3F6 de murino y regiones de marco humanas. En un ejemplo, una cadena ligera que comprende las CDR B3F6 de murino y regiones de marco humanas se combina con una versión humanizada de una cadena ligera B3F6 que comprende por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido de marco humano al correspondiente residuo de aminoácido murino. En otro ejemplo, una versión humanizada de una cadena ligera B3F6 que comprende por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido de marco humano al correspondiente residuo de aminoácido se combina con una versión humanizada de una cadena pesada B3F6 que comprende por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido de marco humano al correspondiente residuo de aminoácido murino. En otro ejemplo, una cadena ligera que comprende las CDR B3F6 de murino y regiones de marco humanas y por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido de marco humano al correspondiente residuo de aminoácido murino se combina con una versión humanizada de una cadena pesada B3F6. Las combinaciones ilustrativas se describen en más detalles en los presentes ejemplos. Por ejemplo, en un caso, la cadena ligera L1 humanizada de los presentes ejemplos se combina con la cadena pesada H1 de los presentes ejemplos para formar el anticuerpo B3F6 humanizado de la versión 1. En otro ejemplo, la cadena ligera L1 humanizada de los presentes ejemplos se combina con la cadena pesada H2 de los presentes ejemplos para formar el anticuerpo B3F6 humanizado de la versión 2. En otro ejemplo, la cadena ligera L1 humanizada de los presentes ejemplos se combina con la cadena pesada H3 de los presentes ejemplos para conformar el anticuerpo B3F6 humanizado de la versión 3. En otro ejemplo, la cadena ligera L2 humanizada de los presentes ejemplos se combina con la cadena pesada H1 de los presentes ejemplos para conformar el anticuerpo B3F6 humanizado de la versión 4. En otro ejemplo, la cadena ligera L2 humanizada de los presentes ejemplos se combina con la cadena pesada H2 de los presentes ejemplos para conformar el anticuerpo B3F6 humanizado de la versión 5. En otro ejemplo, la cadena ligera L2 humanizada de los presentes ejemplos se combina con la cadena pesada H3 de los presentes ejemplos para conformar el anticuerpo B3F6 humanizado de la versión 6. Será obvio para el experto en la técnica que dichas combinaciones están dentro del alcance de la presente descripción.

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción es un anticuerpo preparado mediante la línea celular depositada en American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110 con el número de acceso ATCC _____ bajo las condiciones del Tratado de Budapest.

II. Formas de unir las moléculas

A. Anticuerpos o porciones de los mismos

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción es una molécula de anticuerpo. Por ejemplo, en un caso, una molécula de unión del anticuerpo humanizado de la descripción o su porción que se une a Cripto. En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo humanizado que se une a Cripto y un segundo fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo.

Empleando protocolos reconocidos en la técnica, por ejemplo, los anticuerpos preferiblemente se producen en mamíferos por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (p. ej., antígenos asociados a tumores purificados o células o extractos celulares que comprenden dichos antígenos) y un adyuvante. Esta inmunización típicamente produce una respuesta inmunitaria que comprende la producción de anticuerpos reactivos al antígeno de esplenocitos o linfocitos activados. Si bien los anticuerpos resultantes pueden cosecharse del suero del animal para proveer preparaciones policlonales, a menudo es conveniente aislar los linfocitos individuales del bazo, los ganglios linfáticos o la sangre periférica para proveer preparaciones homogéneas de anticuerpos monoclonales (MAb). Preferiblemente, los linfocitos se obtienen del bazo.

En este procedimiento conocido (Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)), los linfocitos de relativamente corta vida, o mortales, de un mamífero al que se le ha inyectado el antígeno se condensan con una línea celular de tumor inmortal (p. ej., línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que son inmortales y capaces de producir el anticuerpo genéticamente codificado de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas sencillas por selección, dilución y recrecimiento con cada cepa individual que comprende genes

específicos para la formación de un anticuerpo individual. Producen anticuerpos que son homogéneos contra un antígeno deseado y, en referencia a su parentaje genético puro, se denominan "monoclonales".

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y desarrollan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma no condensadas, parentales. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de hibridomas se obtienen en el mercado, y existe una variedad de fuentes y protocolos estandarizados bien consolidados. En general, el medio de cultivo en el que se desarrollan las células de hibridoma se ensaya para producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo *in vitro*, como un radioinmunoensayo (RIA) o inmunoanálisis de absorción (ELISA). Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y desarrollando por métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Se ha de apreciar también que los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero por procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En otro ejemplo, los anticuerpos monoclonales que codifican DNA pueden aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como una fuente preferida de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede disponerse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células hospedantes procariontas o eucariotas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen inmunoglobulinas. Más particularmente, el DNA aislado (que puede ser sintético según se describe en la presente memoria) puede usarse para clonar una secuencia de región constante y variable para la elaboración de anticuerpos según se describe en Newman et al., patente de Estados Unidos Núm. 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995. En esencia, esto comprende la extracción de RNA de células seleccionadas, conversión a cDNA y ampliación por PCR usando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este propósito se describen también en la patente de Estados Unidos núm. 5.658.570. Como se analizará en más detalle a continuación, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden desarrollarse en cantidades relativamente grandes para proporcionar insumos clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

Los expertos en la materia apreciarán que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que codifican (p. ej., sitios de unión al antígeno) pueden también derivar de genotecas de fagos de anticuerpo, p. ej., empleando un fago pd o tecnología de fagómido Fd. Los métodos ilustrativos se exponen, por ejemplo, en el documento EP 368 684 B1; en la patente de Estados Unidos 5.969.108, Hoogenboom, E.J. y Chames. 2000. *Immunol Today* 21:371; Nagy et al. 2002. *Nat. Med.* 8:801; Huie et al. 2001. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 98:2682; Lui et al. 2002. *J. Mol. Biol.* 315:1063. Varias publicaciones (p. ej., Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)) han descrito la producción de anticuerpos humanos de gran afinidad por intercambio de cadenas, como también infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir grandes genotecas de fagos. En otro ejemplo, la exhibición de ribosomas puede utilizarse para reemplazar bacteriófagos como la plataforma de exhibición (véanse, por ejemplo, Hanes et al. 2000. *Nat Biotechnol* 18:1287; Wilson et al. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750; o Irving et al. 2001 *J. Immunol. Methods* 248:31. Incluso en otro ejemplo, las genotecas de superficie celular pueden seleccionarse para anticuerpos (Boder et al. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10701; Daugherty et al. 2000 *J. Immunol. Methods* 243:211. Dichos procedimientos ofrecen alternativas a las técnicas de hibridomas tradicionales para el aislamiento y la subsiguiente clonación de anticuerpos monoclonales.

En otro ejemplo de la presente descripción, un sitio de unión de una molécula de unión de la descripción puede ser provisto por un anticuerpo humano o sustancialmente humano. Los anticuerpos humanos o sustancialmente humanos pueden prepararse en animales transgénicos (p. ej., ratones) incapaces de producción de inmunoglobulina endógena (véanse, por ejemplo las patentes de Estados Unidos núm. 6.075.181, 5.939.598, 5.591.669 y 5.589.369). Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota de la región que se une a la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal quiméricos produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de una ordenación de genes de inmunoglobulina humana a dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Otro medio preferido de generar anticuerpos humanos usando ratones SCID se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5.811.524. Se ha de apreciar que el material genético asociado con estos anticuerpos humanos puede también aislarse y manipularse como se describe en esta memoria.

Incluso otro medio altamente eficiente para generar anticuerpos se describe en Newman, *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992). Específicamente, esta técnica produce la generación de anticuerpos primatizados que contienen

dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Además, esta técnica se describe también en las patentes de Estados Unidos comúnmente cedidas de núm. 5.658.570, 5.693.780 y 5.756.096.

En otro ejemplo, pueden seleccionarse linfocitos por micromanipulación, y pueden aislarse los genes variables. Por ejemplo, se pueden aislar células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden seleccionarse para IgG específicas que satisfacen los criterios de selección. Las células de pocillos positivos pueden aislarse. Las células B que producen Ig individuales pueden aislarse por FACS o identificándolas en un ensayo de placa hemolítica mediado por complemento. Las células B que producen Ig pueden micromanipularse en un tubo y los genes VH y VL pueden ampliarse usando, p. ej., RT-PCR. Los genes VH y VL pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarse en las células (p. ej., eucariotas o procariotas) para expresión.

Asimismo, las secuencias genéticas útiles para producir las moléculas de unión de la presente descripción se pueden obtener de una diversidad de fuentes distintas. Por ejemplo, como se analizó antes ampliamente, existe una diversidad de genes de anticuerpos humanos en la forma de depósitos públicamente accesibles. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpos y los genes que codifican anticuerpos adecuados pueden sintetizarse químicamente a partir de estas secuencias utilizando técnicas reconocidas en la industria. El experto en la materia conoce las técnicas de síntesis de oligonucleótidos compatibles con este aspecto de la descripción, y se pueden llevar a cabo usando cualquiera de diversos sintetizadores automáticos disponibles comercialmente. Además, las secuencias de DNA que codifican varios tipos de cadenas pesadas y ligeras que se exponen en esta memoria pueden obtenerse a través de los servicios de representantes de ventas de DNA. El material genético que se obtiene usando cualquiera de los métodos anteriores puede luego alterarse o sintetizarse para obtener polipéptidos de la presente descripción.

Alternativamente, las líneas celulares que producen anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse usando técnicas conocidas por los expertos. Dichas técnicas se describen en una diversidad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. En este sentido, las técnicas adecuadas para uso en la descripción se describen a continuación en Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991).

Se ha de apreciar también que el alcance de la presente invención abarca además todos los alelos, variantes y mutaciones de las secuencias de DNA de unión a antígenos.

Como se sabe, el RNA puede aislarse de las células de hibridoma originales o de otras células transformadas por técnicas estándar, como extracción y precipitación de isotiocianato de guanidinio seguida de centrifugación o cromatografía. Si se desea, el mRNA puede aislarse del RNA total por técnicas estándar tales como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas resultan familiares en la industria.

En un ejemplo, los DNA que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden prepararse, o bien simultánea o separadamente, usando transcriptasa inversa y DNA polimerasa de acuerdo con métodos conocidos. La PCR puede iniciarse por cebadores de región constante de consenso o por más cebadores específicos en base a las secuencias de aminoácidos y DNA de cadena ligera y pesada publicadas. Como se analizó precedentemente, también puede usarse PCR para aislar clones de DNA que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. En este caso, las genotecas pueden seleccionarse por cebadores de consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de región constante de ratón.

El DNA, típicamente DNA plasmídico, puede aislarse de las células empleando técnicas conocidas en la industria, mapearse por restricción y secuenciarse de acuerdo con técnicas conocidas convencionales expuestas en detalle, p. ej., en las referencias anteriores referidas a técnicas de DNA recombinante. Desde ya, el DNA puede ser sintético de acuerdo con la presente descripción en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o análisis subsiguiente. Los anticuerpos ilustrativos o sus fragmentos para uso en las moléculas de unión de la descripción incluyen anticuerpos que reconocen las dianas que se exponen en esta memoria.

En ciertos casos, el fragmento de anticuerpos de unión al antígeno puede producirse usando técnicas conocidas en la industria.

B. Anticuerpos modificados

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende o consiste en un anticuerpo modificado, es decir, una molécula derivada de un anticuerpo pero que no es un anticuerpo natural, p. ej., minicuerpos (los miracuerpos pueden prepararse usando métodos descritos en la técnica (véanse, p. ej., la patente de Estados Unidos 5.837.821 o el documento WO 94/09817A1)). etc.

1. Anticuerpos que carecen de dominio

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende regiones constantes sintéticas en las que uno o más dominios están parcial o totalmente eliminados ("anticuerpos que carecen de dominio"). En un ejemplo especialmente preferido, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán constructos o variantes que carecen de dominio en donde el dominio CH2 completo ha sido eliminado (constructos ACH2). En otro ejemplo preferido, el dominio eliminado puede sustituirse con un péptido conector corto para proveer flexibilidad y libertad de movimiento para la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos constructos se prefieren particularmente debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en el índice catabólico del anticuerpo.

En otro ejemplo, los anticuerpos modificados de la descripción son anticuerpos que carecen del dominio CH2. Los constructos que carecen de dominio pueden derivarse usando un vector (p.ej., de IDEC Pharmaceuticals, San Diego) que codifica un dominio constante humano de IgG₁ (véanse, p. ej., los documentos WO 02/060955A2 y WO02/096948A2). Este vector ilustrativo se modificó genéticamente para eliminar el dominio CH2 y proveer un vector sintético que expresa una región constante de IgG₁ que carece de dominio. Los genes que codifican la región variable de murino del anticuerpo C2B8, anticuerpo 5E8, anticuerpo B3F6, o la región variable del anticuerpo CC49 humanizado se han insertado en el vector sintético y se han clonado. Cuando se expresaron en células transformadas, estos vectores proporcionaron C2B8.ΔCH2, 5.E8.ΔCH2, B3F6.ΔCH2 o huCC49.ΔCH2 respectivamente. Estos constructos exhiben una serie de propiedades que los convierten en candidatos particularmente atractivos para subunidades monoméricas. Los anticuerpos B3F6 que carecen del dominio humanizado también se han producido y se describen en más detalle en los presentes ejemplos.

Se ha de observar que estos constructos ilustrativos se modificaron genéticamente para condensar el dominio CH3 directamente a una región bisagra de los respectivos polipéptidos de la descripción. En otros constructos, puede ser conveniente proveer un espaciador de péptidos entre la región bisagra y los dominios sintéticos CH2 y/o CH3. Por ejemplo, podrían expresarse constructos compatibles en los que el dominio CH2 ha sido eliminado y el dominio CH3 restante (sintético o no sintético) esté unido a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Dicho espaciador puede añadirse, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Por ejemplo, se puede sustituir el dominio CH2 con un constructo B3F6 que carece de dominio y que tiene un espaciador de aminoácidos corto GGSSGGGGSG (SEQ ID NO. 8) y la región bisagra inferior (B3F6. ΔCH2 [gly/ser]). Otros péptidos conectores ilustrativos se exponen en la Tabla 2. Estos péptidos conectores se pueden usar con cualquiera de los polipéptidos de la descripción. Preferiblemente, los péptidos conectores se usan con un polipéptido que carece del dominio de cadena pesada CH2. Preferiblemente, cualquier enlazador compatible con la presente descripción será relativamente no inmunogénico y no inhibirá la asociación no covalente de los polipéptidos de la descripción.

En un ejemplo, un polipéptido de la descripción comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una eliminación o sustitución de algunos pocos o incluso de un solo aminoácido, siempre y cuando permita la asociación no covalente deseada entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente como para reducir sustancialmente la unión de Fc y aumentar de esta forma la localización del tumor. De modo similar, puede ser conveniente simplemente eliminar esa parte de uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (p. ej., unión de complemento) que se va a modular. Dichas eliminaciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida) mientras se dejen intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante en cuestión. Además, como se mencionó anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil del constructo resultante. En este sentido, puede ser posible romper la actividad provista por un sitio de unión conservado (p. ej., unión a Fc) manteniendo a la vez sustancialmente el perfil de configuración e inmunogénico del anticuerpo modificado. Incluso otro ejemplo preferido puede comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar características deseables tales como la función efectora o proveer más adhesión de citoxina o carbohidrato. En dicho ejemplo, puede ser conveniente insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

Se sabe en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos activa el sistema de complementos. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y puede también implicarse en hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a las células mediante la región Fc, con un sitio receptor de Fc en la unión de la región Fc del anticuerpo al receptor Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores Fc que son específicos para distintas clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) y IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena un número de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen invasión y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpo, aclaramiento de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por linfocitos agresores (que se denomina citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina.

En un ejemplo, las funciones efectoras pueden eliminarse o reducirse usando una región constante de un anticuerpo de IgG4, que se cree incapaz de agotar las células diana, o efectuar variantes de Fc, a menos que los residuos en la región crítica Fc para la función o funciones efectoras se muten usando técnicas conocidas en la industria, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 5.585.097. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando así la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante coherentes con la presente descripción moderen la unión del complemento y reduzcan así la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Incluso otras modificaciones de la región constante pueden usarse para modificar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten una mejor localización debido a un aumento de la especificidad del antígeno o la flexibilidad del anticuerpo. Más en general, los expertos en la técnica sabrán que los anticuerpos modificados descritos en esta memoria pueden ejercer una serie de efectos sutiles que pueden o no apreciarse fácilmente. No obstante, el perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, como localización del tumor, biodistribución y semivida en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas conocidas sin experimentación indebida.

En un ejemplo, las formas modificadas de los anticuerpos pueden prepararse a partir de un anticuerpo precursor u original, empleando técnicas conocidas en la industria. Las técnicas ilustrativas se analizan en más detalle a continuación

Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada puede o no comprender otras secuencias o restos de aminoácidos no derivados de una molécula de inmunoglobulina. Dichas modificaciones se describen en más detalle a continuación. Por ejemplo, en un caso, un polipéptido de la descripción comprende una secuencia enlazadora flexible. En otro caso, un polipéptido puede modificarse para añadir un resto funcional tal como un fármaco o PEG.

2. Moléculas de unión biespecíficas

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción es biespecífica. Por ejemplo, en un caso, una molécula de unión se une a Cripto y a otra molécula. En un ejemplo, una molécula de unión biespecífica de la presente descripción puede comprender un sitio de unión adicional que se une a una o más moléculas tumorales o moléculas asociadas con el desarrollo de células tumorales. En un ejemplo, para trastornos neoplásicos, un sitio de unión al antígeno (es decir, la región variable o su fragmento inmunorreactivo o recombinante) de los polipéptidos descritos se une a una molécula tumoral seleccionada asociada en el sitio de la neoplasia. Dado el número de moléculas reportadas asociadas con el desarrollo de células tumorales neoplásicas, y el número de anticuerpos relacionados, los expertos en la técnica apreciarán que los sitios de unión de las moléculas de unión reivindicadas pueden por lo tanto derivar de uno cualquiera de un número de anticuerpos completos. Más en general, los sitios de unión útiles en la presente descripción se obtienen o derivan de cualquier anticuerpo (incluidos aquellos previamente descritos en la bibliografía) que reacciona con una diana o marcador asociado con la afección seleccionada. A su vez, el anticuerpo original o precursor, o su fragmento, utilizado para generar los polipéptidos descritos, puede ser murino, humano, quimérico, humanizado, de primate no humano o primatizado. En otro ejemplo preferido, los polipéptidos de la presente descripción pueden comprender constructos de anticuerpo de cadena sencilla (como aquel descrito en la patente de Estados Unidos núm. 5.892.019) que tienen dominios constantes alterados como se describe en esta memoria. En consecuencia, cualquiera de estos tipos de anticuerpos puede usarse para obtener un sitio de unión que pueda incorporarse a una molécula biespecífica de la descripción.

Tal como se emplea en esta memoria, "moléculas asociadas a un tumor" significa cualquier molécula diana o de antígeno que en general se asocia con células tumorales, es decir, se expresa en el mismo grado o en un grado mayor en comparación con células normales. Más en general, las moléculas asociadas a tumores comprenden cualquier molécula que proporcione la localización de anticuerpos inmunorreactivos en la célula neoplásica independientemente de su expresión en células no malignas. Dichas moléculas pueden ser relativamente específicas del tumor y limitadas en su expresión a la superficie de células malignas. Alternativamente, dichas moléculas pueden hallarse en células malignas y no malignas. Por ejemplo, CD20 es un antígeno B que se halla en la superficie de todas las células B malignas y no malignas que se ha comprobado que se una diana extremadamente eficaz para anticuerpos inmunoterapéuticos en el tratamiento de linfoma no Hodgkin.

En este sentido, los antígenos de todas las células T, tales como CD2, CD3, CD5, CD6 y CD7, también comprenden moléculas asociadas a tumores dentro del significado de la presente descripción. Incluso otras moléculas asociadas a tumores ilustrativas comprenden, aunque sin limitarse a ello, Lewis Y, MAGE-1, MAGE-3, MUC-1, HPV16, HPV E6 y E7, TAG-72, CEA, antígeno L6, CD19, CD22, CD37, CD52, HLA-DR, receptor EGF y receptor HER2. En muchos casos, los anticuerpos inmunorreactivos para cada uno de estos antígenos se han reportado en la bibliografía. Los expertos en la materia apreciarán que cada uno de estos anticuerpos puede servir como precursor para polipéptidos de la descripción de acuerdo con la presente descripción.

Por consiguiente, un sitio de unión de la presente descripción se puede derivar, generar o fabricar a partir de una cantidad de anticuerpos que reaccionan con moléculas asociadas a tumores. En un ejemplo, el sitio de unión

consiste en anticuerpos sintéticos o que carecen de dominio derivados usando técnicas frecuentes de ingeniería genética mediante las cuales por lo menos una porción de uno o más dominios de regiones constantes se eliminan o alteran como para proporcionar las características bioquímicas deseadas tales como menor semivida en suero. Más particularmente, como se ejemplificará a continuación, el experto en la técnica podrá aislar fácilmente la secuencia genética correspondiente a las regiones variables y/o constantes del anticuerpo en cuestión y eliminar o alterar los nucleótidos apropiados para proveer los polipéptidos de la descripción para uso como subunidades monoméricas de acuerdo con la presente descripción. Se ha de apreciar también que los polipéptidos compatibles de la descripción pueden expresarse y producirse en una escala clínica o comercial usando protocolos bien consolidados.

Los anticuerpos previamente reportados que reaccionan con moléculas asociadas con tumores pueden alterarse como se describe en la presente memoria para proveer uno o más sitios de unión para un polipéptido de la presente descripción. Los anticuerpos ilustrativos que se pueden utilizar para proveer sitios de unión para los polipéptidos en cuestión (o a partir de los cuales pueden derivar los sitios de unión) incluyen, aunque sin limitarse a ello, 2B8 y C2B8 (Zevalin[®] y Rituxan[®], IDEC Pharmaceuticals Corp, San Diego), Lym 1 y Lym 2 (Techniclone), LL2 (immunomedics Corp., New Jersey), HER2 (Herceptin[®], Genentech Inc., South San Francisco), B1 (Bexxar[®], Coulter Pharm., San Francisco), Campath[®] (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge) MB1, BH3, B4, B72.3 (Cytogen Corp.), CC49 (National Cancer Institute) y 5E10 (University of Iowa). En un ejemplo preferido, los polipéptidos de la presente descripción se unirán a los mismos antígenos asociados al tumor que los anticuerpos enumerados inmediatamente arriba. En los ejemplos particularmente preferidos los polipéptidos derivarán o se unirán a los mismos antígenos que 2B8, C2B8, CC49 y C5E10, e incluso más preferiblemente, comprenderán anticuerpos que carecen del dominio (es decir, anticuerpos Δ CH2).

En un primer ejemplo preferido, un polipéptido de la descripción se unirá al mismo antígeno asociado al tumor que Rituxan[®]. Rituxan[®] (también conocido como rituximab, IDEC-C2B8 y C2B8) fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA para el tratamiento de linfoma de células B humano (véanse las patentes de Estados Unidos núm. 5.843.439; 5.776.456 y 5.736.137). Y2B8 (2BS marcado con 90Y; Zevalin[®]; ibritumomab tiuxetan) es el precursor murino de C2B8. Rituxan[®] es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico que inhibe el crecimiento y se ha notificado que sensibiliza ciertas líneas celulares de linfoma para apoptosis por agentes quimioterapéuticos *in vitro*. El anticuerpo se une eficientemente al complemento humano, tiene fuerte unión a FcR y puede destruir eficazmente los linfocitos *in vitro* mediante mecanismos tanto dependientes del complemento (CDC) como del anticuerpo (ADCC) (Reff et al., Blood 83:435-445 (1994)). Los expertos en la técnica apreciarán que las moléculas de unión biespecíficas que se unen a Cripto y a CD20+ de acuerdo con esta descripción pueden usarse en formas conjugadas y no conjugadas para tratar eficazmente a pacientes que presentan tumores malignos CD20+. Más en general, cabe destacar que los polipéptidos descritos en este documento pueden utilizarse o bien "desnudos" o en estado no conjugado o conjugado a un agente citotóxico para tratar eficazmente uno cualquiera de una serie de trastornos.

En otros ejemplos preferidos de la presente descripción, un polipéptido biespecífico de la descripción comprende un sitio de unión del anticuerpo CC49 (o derivado del anticuerpo CC49). Como se mencionó precedentemente, CC49 se une al antígeno asociado al tumor humano TAG-72 que se asocia con la superficie de ciertas células tumorales de origen humano, específicamente la línea de células tumorales LS174T. LS174T [American Type Culture Collection (en este documento ATCC) Núm. CL188] es una variante de la línea de adenocarcinoma de colon LS180 (ATCC Núm. CL187).

Se ha de apreciar que se han desarrollado numerosos anticuerpos monoclonales murinos que tienen especificidad de unión hacia TAG-72. Uno de estos anticuerpos monoclonales, designado B72.3, es una IgG1 de murino producida por el hibridoma B72.3 (ATCC Núm. HB-8108). B72.3 es un anticuerpo monoclonal de primera generación desarrollado usando un extracto de carcinoma de mama humano como el inmunógeno (véanse Colcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78:3199-3203 (1981); y las patentes de Estados Unidos núm. 4.522.918 y 4.612.282. Otros anticuerpos monoclonales dirigidos contra TAG-72 se designan "CC (para cáncer de colon). Como lo describen Schlom et al. (patente de Estados Unidos núm. 5.512.443), los anticuerpos monoclonales CC son una familia de anticuerpos monoclonales murinos de segunda generación que se prepararon usando TAG-72 purificado con B72.3. Dadas las afinidades de unión relativamente buenas hacia TAG-72, los siguientes anticuerpos CC se han depositado en ATCC, con solicitud de acceso restringido: CC49 (ATCC Núm. HB 9459); CC 83 (ATCC Núm. HB 9453); CC46 (ATCC Núm. HB 9458); CC92 (ATCC Núm. HB 9454); CC30 (ATCC Núm. HB 9457); CC11 (ATCC Núm. 9455); y CC15 (ATCC Núm. HB 9460). U.S.P.N. 5.512.443 también describe que los anticuerpos descritos pueden alterarse a su forma quimérica sustituyendo, p. ej., dominios de regiones constantes humanas (Fc) para regiones constantes de anticuerpo de ratón por técnicas de DNA recombinantes conocidas en la industria. Además de describir anticuerpos anti-TAG-72 murinos y quiméricos, Schlom et al. también han producido variantes de un anticuerpo CC49 humanizado como se describe en el documento PCT/US99/25552 y constructos de cadena sencilla según se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5.892.019. Los expertos en la técnica apreciarán que cada uno de los anticuerpos, constructos o recombinantes anteriormente mencionados y sus variantes pueden ser sintéticos y usarse en la preparación de una molécula biespecífica de la descripción.

Además de los anticuerpos anti-TAG-72 anteriormente analizados, diversos grupos también han descrito la construcción y caracterización parcial de anticuerpos CC49 y B72.3 que carecen de dominio (p. ej., Calvo et al. *Cancer Biotherapy*, 8(1):95-109 (1993), Slavin-Chiorini et al. *Int. J. Cancer* 53:97-103 (1993) y Slavin-Chiorini et al. *Cancer. Res.* 55:5957-5967 (1995). Dichos constructos pueden también incluirse en una molécula de unión biespecífica de la descripción.

En un ejemplo, una molécula de unión biespecífica de la descripción se une a CD23 (patente de Estados Unidos 6.011.138). En un ejemplo preferido, una molécula de unión biespecífica de la descripción comprende un sitio de unión que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 5E8. En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción comprende por lo menos una CDR de un anticuerpo anti-CD23, p. ej., el anticuerpo 5E8.

En otro ejemplo, una molécula biespecífica de la presente descripción comprende un sitio de unión derivado del anticuerpo C5E10 (o un sitio de unión que se une al mismo antígeno asociado al tumor que el anticuerpo C5E10). Como se expone en la patente de Estados Unidos 6.207.805, C5E10 es un anticuerpo que reconoce un determinante de glucoproteína de aproximadamente 115 kDa que parece ser específico de líneas celulares de tumor de próstata (p. ej., DU145, PC3 o ND1). Por consiguiente, junto con la presente descripción, los polipéptidos biespecíficos (p. ej., anticuerpos que carecen del dominio CH2) que se unen específicamente al mismo antígeno asociado al tumor reconocido por los anticuerpos C5E10 podrían producirse y utilizarse en forma conjugada o no conjugada para el tratamiento de trastornos neoplásicos. En casos particularmente preferidos, la molécula de unión derivará o comprenderá todo o parte de la región de unión al antígeno del anticuerpo C5E10 tal como la segrega la línea celular de hibridoma que tiene el núm. de acceso en ATCC PTA-865. La molécula de unión resultante podría entonces conjugarse a un radionúclido según lo descrito a continuación y administrarse a un paciente que padece cáncer de próstata de acuerdo con los métodos de la presente memoria.

En otro ejemplo, un ligando puede incluirse en una molécula de unión de la descripción, p. ej., para impartir la unión de un receptor particular, o puede incorporarse un receptor a la molécula de unión, p. ej., para eliminar ligandos de la circulación. Los ligandos ilustrativos y sus receptores que pueden incluirse en las moléculas de unión biespecíficas incluyen:

a. Citocinas o receptores de citocinas

Las citocinas tienen efectos pleiotrópicos sobre la proliferación, diferenciación y activación funcional de linfocitos. Se pueden utilizar diversas citocinas, o porciones de las mismas de unión al receptor, en las proteínas de fusión de la descripción. Las citocinas ilustrativas incluyen interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, 2L-3, IL-4, IL-5, DL-6, IL-7, IL-8, IL-10, EL-11, IL-12, IL-13 y IL-18), los factores estimulantes de colonias (CSF) (p. ej., CSF de granulocitos (G-CSF), CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y CSF de monocitos-macrófagos (M-CSF)), factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta, e interferones tales como interferón α , β o γ (patentes de Estados Unidos núm. 4.925.793 y 4.929.554).

Los receptores de citocinas típicamente consisten en una cadena alfa específica del ligando y una cadena beta común. Los receptores de citocinas ilustrativos incluyen aquellos para GM-CSF, IL-3 (patente de Estados Unidos núm. 5.639.605), IL4 (patente de Estados Unidos núm. 5.599.905), IL-5 (patente de Estados Unidos núm. 5.453.491), IFN γ (documento EP0240975), y la familia de receptores TNF (p. ej., TNF α (p. ej., TNFR-1 (EP 417,563), TNFR-2 (EP 417,014) receptor beta linfotóxica).

b. Proteína de adhesión o sus receptores

Las moléculas de adhesión son proteínas unidas a membranas que permiten que las células interactúen unas con otras. Varias proteínas de adhesión, incluidos los receptores de direccionamiento de leucocitos y las moléculas de adhesión celular, o porciones de las mismas de unión a los receptores, pueden incorporarse a una molécula de unión de la descripción. Los receptores de direccionamiento de leucocitos se expresan en las superficies celulares de los leucocitos durante la inflamación e incluyen las integrinas β -1 (p. ej., VLA-1, 2, 3, 4, 5 y 6) que median la unión de componentes de matriz extracelular, y las integrinas β 2- (p. ej., LFA-1, LPAM-1, CR3 y CR4) que se unen a moléculas de adhesión celular (CAM) en el endotelio vascular. Las CAM ilustrativas incluyen ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y MADCAM-1. Otras CAM incluyen aquellas de la familia selectina, incluidas E-selectina, L-selectina y P-selectina.

c. Quimiocinas o sus receptores

Quimiocinas, proteínas quimiotácticas que estimulan la migración de leucocitos hacia un sitio de infección, también pueden incorporarse a una molécula de unión de la descripción. Las quimiocinas ilustrativas incluyen proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1- α y MIP-1- β), factor quimiotáctico de neutrófilos y RANTES (regulador de la activación de células T normalmente expresadas y segregadas).

d. Factores de crecimiento o receptores de los factores de crecimiento

Los factores de crecimiento o sus receptores (o porciones de los mismos de unión a los receptores o de unión al ligando) o moléculas que se unen a ellos pueden incorporarse a la molécula de unión de la descripción. Los factores de crecimiento ilustrativos incluyen angiopoyetina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus isoformas (patente de Estados Unidos núm. 5.194.596); factores de crecimiento epidérmicos (EGF); factores de crecimiento fibroblásticos (FGF), incluyendo y bFGF; factor natriurético articular (ANF); factores de crecimiento hepáticos (HGF; patentes de Estados Unidos núm. 5.227.158 y 6.099.841), factores neurotróficos tales como el factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como el factor de crecimiento derivado de plaquetas NGF-B (PDGF) (patentes de Estados Unidos núm. 4.889.919, 4.845.075, 5.910.574 y 5.877.016); factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta (WO 90/14359), factores osteoinductivos incluida la proteína morfogenética ósea (BMP); factores de crecimiento de tipo insulina I y H (IGF-I e IGF-II; patentes de Estados Unidos núm. 6.403.764 y 6.506.874); eritropoyetina (EPO); factor de células madre (SCF), trombo-poyetina (ligando C-Mpl) y los polipéptidos Wnt (patente de Estados Unidos núm. 6.159.462).

Los receptores de los factores de crecimiento ilustrativos que se pueden utilizar incluyen receptores EGF (EGFR); receptores VEGF (p. ej., Flt1 o Flk1/KDR), receptores PDGF (WO 90/14425); receptores HGF (patentes de Estados Unidos núm. 5.648.273 y 5.686.292); receptores IGF (p. ej., IGF1R e IGF2R) y receptores neurotróficos, incluido el receptor de baja afinidad (LNGFR), también denominado p75^{NTR} o p75, que se une a NGF, BDNF y NT-3, y los receptores de gran afinidad que son miembros de la familia trk de los receptores de tirosina cinasa (p. ej., trkA, trkB (BP 455,460), trkC (BP 522,530)). En otro ejemplo, tanto IGF1R como VEGF están dirigidos. Incluso en otro ejemplo, VLA4 y VEGF están dirigidos.

Otros receptores de superficie celular y/o sus ligandos pueden también dirigirse (p. ej., los receptores de la familia de TNF o sus ligandos (como se describe aquí en más detalle).

e. Hormonas

Las hormonas de crecimiento o moléculas ilustrativas que se unen a ellas para uso como agentes de direccionamiento en la molécula de unión de la descripción incluyen renina, hormona del crecimiento humana (HGH; patente estadounidense núm. 5.834.598), hormona del crecimiento humana N-metionilo; hormona del crecimiento bobina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea (PTH); hormona estimulante de tiroides (TSH); tiroxina; proinsulina e insulina (patentes de Estados Unidos núm. 5.157.021 y 6.576.608); hormona estimulante de folículos (FSH), calcitonina, hormona luteinizante (LE), leptina, glucagón; bombesina; somatropina; sustancia inhibidora mulleriana; relaxina y prorrelaxina; péptido asociado con gonadotropina; prolactina; lactógeno placentario; proteína OB; o sustancia inhibidora mulleriana.

f. Factores de coagulación

Los factores de coagulación ilustrativos para uso como agentes de direccionamiento en las moléculas de unión de la descripción incluyen factores de coagulación (p. ej., factores V, VII, VIII, X, IX, XI, XII y XIII, factor von Willebrand); factor de tejido (patentes de Estados Unidos núm. 5.346.991, 5.349.991, 5.726.147 y 6.596.84); trombina y protrombina; fibrina y fibrinógeno; activadores de plasmina y plasminógeno tales como urocinasa o urina humana o activador de plasminógeno de tipo tejido (t-PA).

C. Proteínas de fusión

La descripción también se refiere a moléculas de unión que comprenden uno o más dominios de inmunoglobulina. En un ejemplo, las proteínas de fusión de la descripción comprenden un dominio de unión (que comprende por lo menos un sitio de unión) y un dominio de dimerización (que comprende por lo menos una porción de cadena pesada). Por ejemplo, en un caso, una molécula de unión de la descripción puede comprender por lo menos un sitio de unión B3F6 humanizado y un dominio de dimerización. Las proteínas de fusión en cuestión son biespecíficas (con un sitio de unión para una primera diana y un segundo sitio de unión para una segunda diana). En un ejemplo, las proteínas de fusión en cuestión son multivalentes (con dos sitios de unión para la misma diana).

En un ejemplo, una proteína de fusión comprende un sitio de unión B3F6, por lo menos un dominio de la cadena pesada y un péptido conector sintético.

Las proteínas de fusión ilustrativas descritas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon et al., Nature 337:525-531 (1989); Traunecker et al., Nature 339:68-70 (1989); Zettmeissl et al., DNA Cell. Biol. USA 9:347-353 (1990); y Byrn et al., Nature 344:667-670 (1990)); L-selectina (receptor de direccionamiento) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990); y Watson et al., Nature 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Lisley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)); receptor TNF (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991));

Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); y Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)); y receptor IgE a (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Resumen núm. 1448 (1991)).

5 En un ejemplo, cuando se preparan las proteínas de fusión de la presente descripción, el ácido nucleico que codifica un dominio de unión (p. ej., un dominio de unión B3F6 humanizado) se condensará en el término C al ácido nucleico que codifica el término N de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. Las fusiones N-terminales son también posibles. En un ejemplo, una proteína de fusión incluye un dominio CH2 y un dominio CH3. Las fusiones pueden también realizarse al término C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal al CH1 de la cadena pesada o la correspondiente región de la cadena ligera.

10 En un ejemplo, el ligando o el dominio receptor se condensa al término N del dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina. Es también posible condensar toda la región constante de la cadena pesada a la secuencia del ligando o en dirección 5' del sitio de escisión de papaína que define IgG Fc químicamente (es decir, el residuo 216, tomando el primer residuo de la región constante de la cadena pesada como 114), o se utilizan sitios análogos de otras inmunoglobulinas en la fusión. El sitio preciso en el cual se realiza la fusión no es crítico; los sitios particulares se conocen y pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, las características de secreción o
15 unión de la molécula. Los métodos para elaborar proteínas de fusión se conocen en la técnica.

Para proteínas de fusión biespecíficas, las proteínas de fusión se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. En general, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural de cuatro cadenas básica es la forma en la cual existen las IgG, IgD e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular superior; IgM en general
20 existe como pentámero de cuatro unidades básicas combinadas por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, pueden también existir en forma multimérica en suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser la misma o distinta

Las proteínas de fusión se describen, p. ej., en los documentos WO0069913A1 y WO0040615A2. Las proteínas de fusión pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 5.116.964 y 5.225.538). Comúnmente, el ligando o el dominio receptor se condensa en el término C al término N de la región constante de la cadena pesada (o la porción de la cadena pesada) y en lugar de la región variable. Cualquier región transmembrana o Epid o secuencias de reconocimiento de anclaje de fosfolípidos del receptor de unión al ligando preferiblemente se inactivan o eliminan antes de la fusión. El DNA que codifica el ligando o el dominio receptor se escinde por una enzima de restricción en los extremos 5' y 3' o proximales a estos extremos del DNA que codifica el segmento ORF deseado. El fragmento de DNA resultante se inserta luego fácilmente en el DNA que codifica una región constante de cadena pesada. El sitio preciso en el cual se realiza la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión soluble. El DNA que codifica la proteína de fusión se transfecta luego a una célula hospedante para expresión.

35 III. Péptidos conectores sintéticos

En un ejemplo, por lo menos una cadena de polipéptidos de un dímero de la descripción comprende un péptido conector sintético. En un ejemplo, por lo menos dos cadenas de un dímero de la descripción comprenden un péptido conector. En un ejemplo preferido, dos cadenas de un dímero de la descripción comprenden un péptido conector.

40 En un ejemplo, los péptidos conectores pueden usarse para unir dos porciones de la cadena pesada en marco en una cadena de un solo polipéptido. Por ejemplo, en un caso, un péptido conector de la descripción puede usarse para condensar un dominio CH3 (o dominio CH3 sintético) a una región bisagra (o región bisagra sintética). En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción puede usarse para condensar un dominio CH3 (o dominio CH3 sintético) a un dominio CH1 (o dominio CH1 sintético). Incluso en otro ejemplo, un péptido conector puede actuar como espaciador de péptidos entre la región bisagra (o región bisagra sintética) y un dominio CH2 (o un dominio CH2 sintético).

En otro ejemplo, un dominio CH3 puede condensarse a un dominio de proteína extracelular (p. ej., un dominio VL (o dominio sintético), un dominio VH (o dominio sintético), un dominio CH1 (o dominio sintético), un dominio bisagra (o bisagra sintética), o a la porción de unión al ligando de un receptor o a la porción de unión al receptor de un ligando). Por ejemplo, en un caso, un dominio VH o VL se condensa a un dominio CH3 mediante un péptido conector (el término C del péptido conector se une al término N del dominio CH3 y el término N del péptido conector se une al término C del dominio VH o VL). En otro ejemplo, un dominio CH1 se condensa a un dominio CH3 mediante un péptido conector (el término C del péptido conector se une al término N del dominio CH3 y el término N del péptido conector se une al término C del dominio CH1). En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción puede usarse para condensar un dominio CH3 (o dominio CH3 sintético) a una región bisagra (o región bisagra sintética) o su porción. Incluso en otro ejemplo, un péptido conector puede actuar como espaciador de péptidos entre la región bisagra (o región bisagra sintética) y un dominio CH2 (o dominio CH2 sintético).

En un ejemplo, un péptido conector puede comprender o consistir en un espaciador gly/ser. Por ejemplo, se puede sustituir el dominio CH2 con un constructo que carece de dominio que tiene un espaciador de aminoácidos corto GGSSGGGGSG (SEQ ID NO. 8) y la región bisagra inferior (CH2 [gly/ser]). En otro ejemplo, un péptido conector comprende la secuencia de aminoácidos IGTKISKKAK (SEQ ID NO: 15).

- 5 En otro ejemplo, un péptido conector puede comprender por lo menos una porción de una región bisagra de inmunoglobulina. Por ejemplo, pueden construirse dominios bisagra quiméricos que combinan elementos bisagra derivados de distintos isotipos de anticuerpos. En un ejemplo, un péptido conector comprende por lo menos una porción de una región bisagra de IgG1. En otro ejemplo, un péptido conector puede comprender por lo menos una porción de una región bisagra de IgG3. En otro ejemplo, un péptido conector puede comprender por lo menos una porción de una región bisagra de IgG1 y por lo menos una porción de una región bisagra de IgG3. En un ejemplo, un péptido conector puede comprender una bisagra superior y media de IgG1 y un motivo de repetición de la bisagra media de IgG3 sencilla.

- 10 Debido a que la numeración de los aminoácidos individuales en dichos péptidos conectores que comprenden una secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina puede variar dependiendo de la longitud del péptido conector, la numeración de las posiciones de los aminoácidos en estas moléculas se da usando la numeración Kabat, véase, p. ej., la Tabla 2). La Tabla 3 expone la secuencia bisagra natural para moléculas de IgG1, IgG3 e IgG4. La Tabla 2 muestra la numeración Kabat para porciones de estas moléculas bisagra y también muestra la numeración Kabat para residuos de aminoácidos de los péptidos conectores que se exponen en esa Tabla.

- 20 En un ejemplo, un péptido conector de la descripción comprende un dominio de la región bisagra de inmunoglobulina no natural, p. ej., un dominio de la región bisagra de inmunoglobulina que no se halla naturalmente en el polipéptido que comprende el dominio de la región bisagra y/o un dominio de la región bisagra que ha sido alterado de modo tal que difiere en la secuencia de aminoácidos de un dominio de región la bisagra de inmunoglobulina natural. En un ejemplo, pueden hacerse mutaciones en los dominios de la región bisagra para obtener un péptido conector de la descripción. En un ejemplo, un péptido conector de la descripción comprende un dominio bisagra que no comprende un número de cisteínas naturales, es decir, el péptido conector comprende o bien menos cisteínas o un número mayor de cisteínas que una molécula bisagra natural. En un ejemplo preferido, la incorporación del péptido conector a un polipéptido resulta en una composición que es mayor que 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las moléculas dimericas presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están enlazadas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas.

- 35 En un ejemplo de la descripción, el péptido conector comprende un dominio de la región bisagra que comprende un residuo prolina en una posición del aminoácido correspondiente a la posición del aminoácido 243 en el sistema de numeración Kabat (posición 230, sistema de numeración EU). En un ejemplo, un péptido conector comprende un residuo alanina en una posición del aminoácido correspondiente a la posición 244, sistema de numeración Kabat (posición 246, sistema de numeración EU). En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción comprende un residuo prolina en una posición del aminoácido correspondiente a la posición 245 (sistema de numeración Kabat; posición 247, sistema de numeración EU)). En un ejemplo, un péptido conector comprende un residuo cisteína en una posición del aminoácido correspondiente a la posición 239, sistema de numeración Kabat (posición 226, sistema de numeración EU). En un ejemplo, un péptido conector comprende un residuo serina en una posición del aminoácido correspondiente a la posición 239, sistema de numeración Kabat (posición 226, sistema de numeración EU). En un ejemplo, un péptido conector comprende un residuo cisteína en una posición del aminoácido correspondiente a la posición 242, sistema de numeración Kabat (posición 229, sistema de numeración EU). En un ejemplo, un péptido conector comprende un residuo serina en una posición del aminoácido correspondiente a la posición 242, sistema de numeración Kabat (posición 229, sistema de numeración EU).

- 45 En un ejemplo, el péptido conector puede seleccionarse para dar como resultado la síntesis preferencial de una isoforma particular del polipéptido, p. ej., en la que la dos porciones de cadena pesada están unidas por enlaces disulfuro o no están unidas por enlaces disulfuro. Por ejemplo, como se describe en estos ejemplos, el enlazador G1/G3/Pro243 + [gly/ser] (SEC. ID. NÚM: 26), G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [gly/ser] (SEC. ID. NÚM: 5), el enlazador Pro243 + [gly/ser] (SEC. ID. NÚM: 33) y el enlazador Pro243Ala244Pro245 + [gly/ser] (SEC. ID. NÚM: 32), los péptidos conectores resultaron en la producción de solamente el anticuerpo que carece de dominio CH2 de la Forma A sin la Forma B detectable. En contraste, Cys242Ser:Pro243 (SEC. ID. NÚM: 31) que carece del dominio CH2, y Cys242Ser:Pro243Ala244Pro245 (SEC. ID. NÚM: 32) que carece del dominio CH2, resultaron ambos en una preferencia para la isoforma de la Forma B. Estos péptidos conectores de la región bisagra sintética serían por lo tanto útiles para favorecer la síntesis de la isoforma de la Forma A o la Forma B. Esto es así para cualquier tipo de anticuerpo, (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) basado en el alto grado de homología entre los dominios CH3 para los cuatro isotipos humanos, (incluyendo residuos de aminoácidos idénticos y conservados, el dominio CH3 de IgG1 es 98,13% homólogo a CH3 de IgG2, 97,20% homólogo a CH3 de IgG3 y 96,26% homólogo a CH3 de IgG4). Los paréntesis que hacen referencia a los péptidos conectores y diversas moléculas de unión de la descripción representan terminología equivalente, a menos que se indique lo contrario.

En un ejemplo, un péptido conector de la descripción comprende un dominio de región bisagra seguido de un enlazador flexible gly/ser. Los péptidos conectores se exponen en la Tabla 2 y en las SEQ ID NO: 5, 25-34. Se ha de entender que las formas variantes de estos péptidos conectores ilustrativos pueden crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido conector, de modo tal que se introducen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en el péptido conector. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones por técnicas estándar, como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se realizan sustituciones de aminoácidos conservadores en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales, de forma tal de no alterar la capacidad del péptido conector de mejorar la síntesis de la Forma A o la Forma B. Por consiguiente, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina preferiblemente se reemplaza con otro residuo de aminoácido de la familia de la misma cadena lateral. En otro ejemplo, una hilera de aminoácidos puede reemplazarse con una hilera estructuralmente similar que difiera en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de la cadena lateral.

Los péptidos conectores de la descripción pueden tener longitudes variables. En un ejemplo, un péptido conector de la descripción tiene entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción tiene entre aproximadamente 20 y aproximadamente 45 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción tiene entre aproximadamente 25 y aproximadamente 40 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción tiene entre aproximadamente 24 y aproximadamente 27 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, un péptido conector de la descripción tiene entre aproximadamente 40 y aproximadamente 42 aminoácidos de longitud.

Los péptidos conectores pueden introducirse en las secuencias de polipéptidos usando técnicas conocidas en la industria. Por ejemplo, en un caso, puede emplearse el método de Empalme por Extensión Superpuesta (*Splicing by Overlap Extension* o *SOE*) (Horton, R.M. 1993 *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15 :PCR Protocols: Current Methods and applications. Ed. B.A. White). Las modificaciones pueden confirmarse por análisis de secuencias de DNA. Se puede utilizar DNA plasmídico para transformar células hospedantes para producción estable de los polipéptidos producidos.

En un ejemplo, la incorporación de uno de los péptidos conectores en cuestión a un polipéptido produce una composición que comprende moléculas de unión que tienen por lo menos dos sitios de unión y por lo menos dos cadenas de polipéptidos, en donde por lo menos dos de las cadenas de polipéptidos comprenden un péptido conector sintético y en donde más de 50% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 60% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 70% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 80% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 90% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas.

IV. Expresión de moléculas de unión

Siguiendo la manipulación del material genético aislado para proveer los polipéptidos de la descripción tal como se expuso anteriormente, los genes típicamente se insertan en un vector de expresión para introducción en las células hospedantes que se pueden utilizar para producir la cantidad deseada de polipéptido que, a su vez, proporciona las moléculas de unión reivindicadas.

El término "vector" o la expresión "vector de expresión" se emplea en el presente documento para los propósitos de la memoria y las reivindicaciones, y significa vectores utilizados de acuerdo con la presente descripción como vehículo para introducirse en y expresar un gen deseado en una célula. Como sabrán los expertos en la técnica, dichos vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente descripción comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción correctos para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de ingresar y/o replicarse en eucariotas o procariontas.

Para los fines de esta descripción, se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de DNA que derivan de virus animales tales como papiloma virus bovino, polioma virus, adenovirus, virus variolovacunal, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión al ribosoma. Además, las células que han integrado el DNA en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de células hospedantes transfectadas. El marcador puede proporcionar profeta a un hospedante auxotrófico, resistencia biocida (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede o bien unirse directamente a las secuencias de DNA que se han de expresar, o

introducirse en la misma célula por cotransformación. Pueden también ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de mRNA. Estos elementos pueden incluir secuencias de señales, señales de empalme, como también promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación. En un ejemplo particularmente preferido, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (preferiblemente humanos) sintéticos según se analizó precedentemente. Preferiblemente, esto se realiza usando un vector de expresión privado de IDEC, Inc., denominado NEOSPLA (patente de Estados Unidos 6.159.730). Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta globina, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino, neomicina fosfotransferasa exón 1 y exón 2, el gen de dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Como se puede observar en los ejemplos a continuación, se ha descubierto que este vector resulta en un muy alto nivel de expresión de anticuerpos tras la incorporación de genes de región variable y constante, transfección en células CHO, seguida de selección en medio que contiene G418 y ampliación con metotrexato. Los sistemas de vectores se describen en las patentes de Estados Unidos núm. 5.736.137 y 5.658.570. Este sistema ofrece altos niveles de expresión, p. ej., >30 pg/célula/día. Otros sistemas de vectores ilustrativos se describen, p. ej., en la patente de Estados Unidos 6.413.777.

En otro ejemplo preferido, los polipéptidos de la presente descripción pueden expresarse usando constructos policistrónicos. En estos nuevos sistemas de expresión pueden producirse múltiples productos génicos de interés tales como las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de un solo constructo policistrónico. Estos sistemas utilizan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de los polipéptidos de la descripción en células hospedantes eucariotas. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión pueden usarse para producir eficazmente la gama completa de polipéptidos descrita en la presente solicitud.

Más en general, una vez que se ha preparado el vector o la secuencia de DNA que codifica una subunidad monomérica del polipéptido (p. ej., un anticuerpo modificado), el vector de expresión puede introducirse en una célula hospedante apropiada. Es decir, las células hospedantes pueden transformarse. La introducción del plásmido en la célula hospedante puede lograrse mediante diversas técnicas conocidas por los expertos. Éstas incluyen, aunque sin limitarse a ello, transfección (incluidas la electroforesis y la electroporación), fusión de protoplastos, precipitación de fosfato de calcio, fusión celular con DNA encapsulado, microinyección e infección con un virus intacto. Véanse, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Capítulo 24.2, pág. 470-472 Vectors, Rodríguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Más preferiblemente, la introducción del plásmido en el hospedante se realiza mediante electroporación. Las células transformadas se desarrollan bajo condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se ensayan para síntesis de proteínas de las cadenas ligeras y/o pesadas. Las técnicas de ensayo ilustrativas incluyen inmunoanálisis de absorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis con clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "transformación" se usa en un sentido amplio para hacer referencia a la introducción de DNA en una célula hospedante de un receptor que cambia el genotipo y en consecuencia produce un cambio en la célula del receptor.

En esas mismas líneas, "células hospedantes" se refiere a células que han sido transformadas con vectores contruidos empleando técnicas de DNA recombinante y codificando por lo menos un gen heterólogo. En descripciones de procesos para aislamiento de anticuerpos de hospedantes recombinantes, el término "célula" y la expresión "cultivo celular" se utilizan de manera intercambiable para indicar el origen del anticuerpo, a menos que se especifique claramente algo distinto. En otros términos, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar o bien de células enteras centrifugadas o de cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

La línea celular hospedante utilizada para la expresión de proteínas es más preferiblemente de origen mamífero; los expertos en la técnica poseen la capacidad de determinar preferencialmente las células hospedantes particulares más adecuadas para el producto génico deseado que se ha de expresar. Las líneas celulares hospedantes ilustrativas incluyen, aunque sin limitarse a ello, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR meno), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno SV40 T), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/0 (mieloma de ratón), P3.times.63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAH (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Las células CHO se prefieren particularmente. Las líneas celulares hospedantes típicamente se obtienen de servicios comerciales, de American Tissue Culture Collection o de la bibliografía publicada.

La producción *in vitro* permite aumentar la escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para cultivo celular de mamíferos bajo condiciones de cultivo de tejido se conocen en la industria e incluyen

cultivo de suspensión homogénea, p. ej., en un reactor aéreo o en un reactor agitador continuo, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej., en fibras huecas, microcápsulas, en microesferas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si es necesario y/o conveniente, las disoluciones de polipéptidos pueden purificarse por métodos cromatográficos habituales, por ejemplo filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno-)afinidad, p. ej., después de biosíntesis preferencial de un polipéptido de región bisagra sintético o antes o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en este documento.

Los genes que codifican el polipéptido de la descripción pueden también expresarse en células no mamíferas tales como células de bacterias o de levadura, o células vegetales. En este sentido, se ha de apreciar que también pueden transformarse diversos microorganismos no mamíferos unicelulares, tales como bacterias, es decir, aquellos capaces de desarrollarse en cultivos o fermentación. Las bacterias que son susceptibles a la transformación incluyen miembros de enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Barillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos típicamente se convierten en parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos deben aislarse, purificarse y luego ensamblarse en moléculas funcionales. Si se desean formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se autoensamblarán luego en anticuerpos tetravalentes (documento WO02/096948A2).

Además de procariotas, también se pueden emplear microbios de eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la que se utiliza más frecuentemente entre los microorganismos eucarióticos, aunque existe una cantidad de otras cepas disponibles. Para expresión en *Saccharomyces*, se utiliza comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de desarrollarse en triptófano, por ejemplo ATCC núm. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión trp1 como característica del genoma de célula hospedante de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

V. Separación de moléculas de unión que comprenden por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas a partir de aquellas que carecen de enlace disulfuro entre cadenas

En un aspecto, la descripción se refiere a la separación de moléculas que tienen dos porciones de cadena pesada de una mezcla, en donde una fracción de las moléculas está presente en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas y una fracción de las moléculas comprende porciones de cadena pesada que no están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro por cromatografía de interacción hidrófoba. La cromatografía de interacción hidrófoba se desarrolló por primera vez siguiendo la observación de que las proteínas podrían ser retenidas en geles de afinidad que comprendían brazos espaciadores hidrocarbonados pero que carecían del ligando de afinidad. La elución de soportes HIC puede efectuarse mediante alteraciones en disolvente, pH, fuerza iónica, o por adición de agentes caotrópicos o modificadores orgánicos, como etilen o propilenglicol. Una descripción de los principios generales de la cromatografía de interacción hidrófoba puede hallarse, p. ej., en la patente de Estados Unidos 3.917.527 y en la patente de Estados Unidos 4.000.098. Se ha usado HIC en el contexto de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para separar fragmentos de anticuerpos que carecen de las porciones de cadena pesada (p. ej., F(ab')₂) de moléculas de anticuerpos intactos en un protocolo de una sola etapa. (Morimoto, K. et al., L Biochem. Biophys. Meth. 24:107 (1992)).

El método de separación de la descripción puede llevarse a cabo en una población no purificada de polipéptidos (p. ej., sobrenadantes de cultivos o preparaciones de polipéptidos aislados de cuerpos de inclusión procarióticos). Alternativamente, los métodos de separación de la presente invención pueden usarse en mezclas de polipéptidos obtenidas después de una o más etapas de purificación inicial, p. ej., después de que una preparación que comprende las formas A y B se ha eluido de una matriz de afinidad.

En un ejemplo, las moléculas de unión sometidas a cromatografía HIC comprenden un péptido conector de la descripción.

En un ejemplo preferido, se puede aplicar HIC a mezclas que han sido parcialmente purificadas por otros procedimientos de purificación de proteínas. La expresión "parcialmente purificada", tal como se emplea en esta memoria, incluye la preparación de una proteína en la que la proteína de interés está presente en por lo menos 5% en peso, más preferiblemente en por lo menos 10% y lo más preferiblemente en por lo menos 45%. Las etapas de purificación iniciales o subsiguientes pueden utilizarse para eliminar, p. ej., agregados de inmunoglobulina, especies mal plegadas, proteína de células hospedantes, material de residuo de etapas cromatográficas anteriores (como Proteína A, si se emplea). En un ejemplo, puede utilizarse HIC en polipéptidos que comprenden un péptido conector de la descripción. Por consiguiente, la aplicación de HIC puede también apreciarse en el contexto de un protocolo de purificación general. Las etapas de purificación ilustrativas que se pueden emplear antes o después de HIC incluyen: cromatografía de afinidad (por ejemplo, PROSEP-A[®] (BioProcessing Ltd., Reino Unido) que consiste en Proteína A

covalentemente acoplada a vidrio de poro controlado o Proteína A SEPHAROSE[®] Fast Flow (Pharmacia) o Proteína A TOYOPEARL 650M (TosoHaas)). La Proteína A se prefiere para cadenas pesadas humanas y1, y 2 o y 4 y la proteína G para isotipos de ratón. Se puede usar la resina Bakerbond ABXtm si la molécula comprende un dominio CH3. Además o alternativamente, se puede emplear cromatografía de intercambio iónico. En este sentido, pueden unirse varios sustituyentes aniónicos o catiónicos a matrices con el fin de formar soportes aniónicos o catiónicos para cromatografía. Los sustituyentes de intercambio aniónico incluyen dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y grupos amina cuaternarios (Q). Los sustituyentes de intercambio catiónico incluyen carboximetilo (CM), sulfoetilo (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Las resinas de intercambio iónico de celulosa tales como DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 y CM-52 son comercializadas por Whatman Ltd. Maidstone, Kent, Reino Unido. También se conocen los intercambiadores iónicos reticulados y basados en SEPHADEX[®]. Por ejemplo, DEAE-, QAE-, CM- y SP- SEPHADEX[®] y DEAE-, Q-, CM- y S-SEPHAROSE[®] y SEPHAROSE[®] Fast Flow son comercializados por Pharmacia AB. Además, el copolímero de etilenglicol-metacrilato derivado tanto de DEAE como de CM, tal como TOYOPEARL DEAE-650S o M y TOYOPEARL CM-650S o M es comercializado por Toso Haas Co., Filadelfia, Pa. Ya que la elución de soportes de intercambio iónico por lo general implica la adición de sal y dado que HIC se potencia a mayores concentraciones de sal, se prefiere la introducción de una etapa HIC después de una etapa cromatográfica de intercambio iónico u otra etapa de purificación mediada por sal. Pueden añadirse protocolos de purificación adicionales que incluyen, aunque sin limitarse a ello, otra cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, inactivación vírica, concentración y liofilización, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEQHAROSE[™], cromatofocalización o precipitación de sulfato de amonio.

Antes de la purificación usando los métodos en cuestión, la composición que comprende la mezcla de los polipéptidos que se han de separar preferiblemente se dispondrá en un tampón de pH ácido o aproximadamente neutro. Esto puede realizarse, por ejemplo, añadiendo tampón concentrado, resuspendiendo la muestra en el tampón, intercambiando el tampón (p. ej., usando diálisis o ultrafiltración). Alternativamente, el pH del tampón de muestra puede simplemente ajustarse para estar dentro del intervalo deseado.

Las interacciones hidrófobas son las más fuertes a fuerza iónica alta, por lo tanto, esta forma de separación se realiza convenientemente después de las precipitaciones de sal o de los procedimientos de intercambio iónico. La adsorción de las proteínas a una columna de HIC se favorece con las altas concentraciones de sal, pero las concentraciones reales pueden variar en un amplio intervalo, dependiendo de la naturaleza de la proteína y del ligando de HIC particular elegido. Se pueden disponer diversos iones en una llamada serie solufóbica dependiendo de si promueven las interacciones hidrófobas (remoción de sales) o rompen la estructura del agua (efecto caotrópico) y conducen al debilitamiento de la interacción hidrófoba. Los cationes se clasifican en términos de aumento del efecto de remoción de sales como Ba^{++<}; Ca^{++<}; Mg^{++<}; Li^{+<}; Cs^{+<}; Na^{+<}; K^{+<}; Rb^{+<}; NK4^{+<}, mientras que los aniones pueden clasificarse en términos de aumento del efecto caotrópico como PO^{-<}; SO^{-<}; CH₃COOO^{-<}; Cl^{-<}; Br^{-<}; NO₃^{-<}; ClO₄^{-<}; I^{-<}; SCN^{-<}

En general, los sulfatos de Na, K o NH₄ promueven eficazmente la interacción ligando-proteína en HIC. Pueden formularse sales que influyan en la fuerza de la interacción según la siguiente relación: (NH₄)₂SO₄>; Na₂SO₄>; NaCl>; NH₄Cl>; NaBr>; NaSCN. En general, son útiles las concentraciones de sales entre aproximadamente 0,75 y aproximadamente 2M sulfato de amonio o entre 1 y 4M NaCl.

Puede emplearse una serie de soportes cromatográficos en la preparación de columnas de HIC, donde los más ampliamente utilizados consisten en resinas de agarosa, sílice y polímero o copolímero orgánico. El material de interacción hidrófoba en general es una matriz de base (p. ej., carbohidrato hidrófilo (como agarosa entrecruzada) o material de copolímero sintético) al que se acoplan ligandos hidrófobos (p. ej., grupos alquilo o arilo). El material de HIC preferido comprende una resina de agarosa sustituida con grupos fenilo. El material de HIC ilustrativo incluye Phenyl-SEPHAROSE[™], FAST FLOW con baja o alta sustitución (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna de alta resolución Phenyl SEPHAROSE[™], Phenyl- o Butyl-SEPHAROSE[®] CL-4B, Butyl-SEPHAROSE[®] FF, Octyl-SEPHAROSE[®] FF y Phenyl-SEPHAROSE[®] FF (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Suecia); Fractogel™ EMD Propilo o columnas FRACTOGEL™ EMC Phenyl (E. Merck, Alemania); soportes MACROPREP™ Metilo o MACROPREP™ t-Butilo (Bio-Rad, California); columna WP HI-Propyl (C3)[™] (J.T. Baker, New Jersey). Los materiales de HIC ilustrativos también son comercializados por Tosoh Corporation, Tokio, Japón con los nombres TOYOPEARL éter 650, fenilo 650, butilo 650 (Fractogel), éter-5PW-HR o fenil-5FW-HR; Miles-Yeda, Rehovot, Israel con el nombre del producto alquil-agarosa, en donde el grupo alquilo contiene 2-10 átomos de carbono, y J.T. Baker, Phiffipsburg, N.J. con el nombre Bakerbond WP-HI-propilo. También es posible preparar la columna de HIC deseada usando química convencional (por ejemplo, Er-el, Z. Biochem. Biophys. Res. Comm. 49:383 (1972) o Ulbrich, V. rd gL Coll. Czech. Chem. Commum. 9:1466 (1964)).

El experto en la técnica puede determinar la opción de un gel en particular. En general, la fuerza de la interacción de la proteína y el ligando de HIC aumenta con la longitud de la cadena de los ligandos alquilo, pero los ligandos que tienen entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8 átomos de carbono son adecuados para la mayoría de las

separaciones. Un grupo fenilo tiene aproximadamente la misma hidrofobicidad que el grupo pentilo, aunque la selectividad puede ser diferente debido a la posibilidad de interacción orbital pi-pi con grupos aromáticos en la proteína. Selectivamente puede también verse afectado por la química de la resina de soporte.

5 La densidad del ligando es un parámetro importante que influye no solamente en la fuerza de la interacción sino también en la capacidad de la columna. La densidad del ligando de los geles de fenilo u octilo comerciales está en el orden de 40 pmoles/ml de lecho de gel. La capacidad del gel es una función de la proteína particular en cuestión como también del pH, la temperatura y el tipo y la concentración de sal, pero en general puede esperarse que esté en el intervalo de 3-20 mg/ml de gel.

10 En general, una reducción de la temperatura disminuye la interacción con el material de HIC. No obstante, cualquier beneficio que se obtenga incrementando la temperatura debe también ponderarse contra los efectos adversos tales como los que puede representar un incremento sobre la estabilidad de la proteína.

15 En un ejemplo, los polipéptidos de la descripción pueden eluirse de manera isocrática. En la elución isocrática, todos los compuestos comienzan la migración a través de la columna al inicio. No obstante, cada uno migra a una velocidad diferente, lo que resulta en un índice de elución más veloz o más lento. Por ejemplo, como se describe en estos ejemplos, la forma A puede eluirse con el flujo a través de la columna.

En otro ejemplo, uno o más polipéptidos de la descripción pueden unirse a la columna y eluirse, p. ej., usando una elución en etapas o elución en gradiente. La elución, o bien en etapas o en la forma de un gradiente, puede lograrse mediante diversas formas:

20 (a) cambiando la concentración salina, (b) cambiando la polaridad del disolvente o (c) añadiendo detergentes. Al disminuir la concentración salina, las proteínas adsorbidas se eluyen con el fin de aumentar la hidrofobicidad. Los cambios en la polaridad pueden efectuarse con adiciones de disolventes tales como etileno o propilenglicol, o (iso)propanol, disminuyendo así la fuerza de las interacciones hidrófobas. Los detergentes funcionan como agentes de desplazamiento de proteínas y se han usado principalmente en relación con la purificación de proteínas de membrana

25 Al efectuar la separación, la mezcla de polipéptidos puede entrar en contacto con el material de HIC, p. ej., usando una técnica de purificación por lotes o usando una columna. Antes de la purificación HIC, puede ser conveniente eliminar cualquier agente caotrópico o sustancias muy hidrófobas, p. ej., pasando la mezcla por una precolumna.

30 Por ejemplo, para purificación de lotes, el material de HIC se prepara en el tampón de partida deseado o se equilibra hasta dicho tampón. Se obtiene una suspensión del material de HIC. La disolución de polipéptido se pone en contacto con la suspensión para adsorber por lo menos uno de los polipéptidos que se van a separar al material de HIC. La disolución que contiene los polipéptidos que no se unen al material de HIC se separa de la suspensión, p. ej., dejando que la suspensión sedimente y eliminando el sobrenadante. La suspensión puede someterse a una o más etapas de lavado. Si se desea, la suspensión puede ponerse en contacto con una disolución de conductividad inferior para desorber los polipéptidos que se han unido al material de HIC. Con el propósito de eluir los polipéptidos unidos, puede reducirse la concentración de sal.

35 En un ejemplo, el material de HIC puede rellenarse en una columna. Puede aplicarse a la columna una mezcla que comprenda los polipéptidos que se van a separar, permitiendo que por lo menos uno de los polipéptidos que se van a separar se adsorba en la columna. Los polipéptidos que no se adsorben en la columna pasan y pueden recogerse. Con el fin de eluir los polipéptidos unidos, puede reducirse la concentración de sal, p. ej., en un modo escalonado o usando un gradiente de sal

40 Ya que la forma B es más hidrófoba que la forma A, se adsorbe irreversiblemente en la fase estacionaria usando aproximadamente 0,7 M (p. ej., 0,73M) sulfato de amonio/20 mM sulfato de sodio, pH 4,0 a pH 8,0 como la fase móvil. La forma A se une en un grado menor a la fase estacionaria bajo estas condiciones y en consecuencia se eluye de manera isocrática, es decir, deja la columna con la fracción de flujo. Después de la elución isocrática de la forma A, la omisión del sulfato de amonio de la fase móvil desorbe la forma B.

45 En un esquema de purificación ilustrativo, el material de HIC se equilibra en un tampón que comprende una concentración de sal, produciendo una conductividad entre aproximadamente 160 y aproximadamente 110, preferiblemente entre aproximadamente 140 y aproximadamente 115, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 130 o aproximadamente 120 y aproximadamente 117 mS/cm. Por ejemplo, una disolución de partida ilustrativa comprende una concentración de sal de aproximadamente 1M a 0,7M, p. ej., 1M a 0,7M sulfato de amonio. En un ejemplo preferido, la disolución que comprende la mezcla de los polipéptidos que se han de separar también se lleva a la misma, o aproximadamente la misma, conductividad (p. ej., usando una disolución salina precursora concentrada). Bajo estas condiciones, la Forma A se eluye de la columna a una conductividad de aproximadamente 120mS/cm. Para eluir la forma B, se puede aplicar a la columna un gradiente lineal o gradual de

reducción del contenido del sulfato de amonio. La forma B se eluye a una conductividad de aproximadamente 115 a aproximadamente 100mS/cm.

En un ejemplo, el método de purificación en cuestión produce una composición que comprende moléculas de unión que tienen por lo menos dos sitios de unión y dos porciones de cadena pesada, en donde las porciones de cadena pesada carecen de los dominios CH2 y en donde más de 50% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 60% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 70% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 80% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas. En otro ejemplo, más de 90% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas.

En un ejemplo, el método de purificación en cuestión produce una composición que comprende moléculas de unión recombinantes que tienen por lo menos dos sitios de unión y dos porciones de cadena pesada, en donde más de 99% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas.

En un ejemplo, el método de purificación en cuestión produce una composición que comprende moléculas de unión que tienen por lo menos dos sitios de unión y dos porciones de cadena pesada, en donde más de 95% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas, y en donde las porciones de cadena pesada de los polipéptidos derivan de un anticuerpo del isotipo IgG4.

En un ejemplo, el método de purificación en cuestión produce una composición que comprende moléculas de unión que tienen dos porciones de cadena ligera y dos porciones de cadena pesada, en donde las porciones de cadena pesada carecen de los dominios CH2 y en donde más de 80% de las moléculas están presentes en una forma en la que las dos porciones de cadena pesada no están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas.

En otro aspecto, la presente descripción provee además métodos para monitorear los resultados de la purificación y/o biosíntesis preferencial, que comprenden medir las cantidades relativas de la Forma A y la Forma B en una composición. La Forma A y la Forma B pueden medirse, p. ej., como se describe en este documento, usando electroforesis de gel de poli(acrilamida) SDS no reductor o espectrometría de masas.

VI Marcado o conjugación de moléculas de unión

Las moléculas de unión de la presente descripción se pueden utilizar en forma no conjugada o pueden conjugarse a por lo menos uno de una diversidad de efectores, es decir, restos funcionales, p. ej., para facilitar la detección diana o para tomar imágenes o para terapia del paciente. Los polipéptidos de la descripción se pueden marcar o conjugar o bien antes o después de la purificación, si es que se realiza la purificación. En particular, los polipéptidos de la presente descripción pueden conjugarse a citotoxina (como radioisótopos, fármacos citotóxicos o toxinas), agentes terapéuticos, agentes citostáticos, toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de respuesta biológica, agentes farmacéuticos, ligandos inmunológicamente activos (p. ej., linfocinas u otros anticuerpos en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como a una célula efectora, tal como una célula T), PEG o restos detectables útiles en la toma de imágenes. En otro ejemplo, un polipéptido de la descripción puede conjugarse a una molécula que reduce la vascularización de tumores. En otro ejemplo, las composiciones descritas pueden comprender los polipéptidos de la descripción acoplados a fármacos o profármacos. Incluso en otro ejemplo, la presente descripción comprende el uso de los polipéptidos de la descripción conjugados a biotoxinas específicas o a sus fragmentos citotóxicos tales como ricina, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de difteria. La elección de usar el polipéptido conjugado o no conjugado dependerá del tipo y del estadio del cáncer, del uso de tratamiento complementario (p. ej., quimioterapia o radiación externa) y del estado del paciente. Se ha de apreciar que el experto en la técnica podría realizar dicha elección fácilmente en vista de las descripciones del presente documento.

Se ha de apreciar que, en estudios anteriores, se han utilizado exitosamente anticuerpos anti-tumor marcados con isótopos para destruir células en tumores sólidos como también linfomas/leucemias en modelos animales, y en algunos casos en seres humanos. Los radioisótopos ilustrativos incluyen: ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re y ^{188}Re . Los radionúclidos actúan produciendo radiación ionizante que causa múltiples rupturas de hebras en el DNA nuclear, conduciendo a la muerte celular. Los isótopos utilizados para producir conjugados terapéuticos típicamente producen partículas α o β de gran energía que tienen una corta longitud de trayecto. Dichos radionúclidos destruyen las células a las que están próximos, por ejemplo células neoplásicas a las que se ha unido o en las cuales ha ingresado el conjugado. Tienen poco o ningún efecto sobre las células no localizadas. Los radionúclidos son esencialmente no inmunogénicos.

Con respecto al uso de conjugados radiomarcados junto con la presente descripción, los polipéptidos de la descripción pueden marcarse directamente (como a través de yodinación) o pueden marcarse indirectamente a través del uso de un agente quelante. Tal como se emplean en esta memoria, las frases "marcado indirecto" y "planteamiento de marcado indirecto" significan ambas que un agente quelante se une covalentemente a una molécula de unión y por lo menos un radionúclido se asocia con el agente quelante. Dichos agentes quelantes típicamente se denominan agentes quelantes bifuncionales, ya que se unen tanto al polipéptido como al radioisótopo. Los agentes quelantes particularmente preferidos comprenden ácido 1-isotiocianatobencil-3-metilditileno triaminapentaacético ("MX-DTPA") y derivados de ácido ciclohexil dietileno triaminapentaacético ("CHX-DTPA"). Otros agentes quelantes comprenden derivados de P-DOTA y EDTA. Los radionúclidos particularmente preferidos para marcado indirecto incluyen ^{111}In y ^{90}Y .

Tal como se emplean en la presente memoria, las expresiones "marcado directo" y "planteamiento de marcado directo" significan ambas que un radionúclido está covalentemente unido a un polipéptido (típicamente vía un residuo de aminoácido). Más específicamente, estas tecnologías de unión incluyen marcado aleatorio y marcado dirigido al sitio. En el último caso, el marcado se dirige a sitios específicos en el polipéptido, tales como residuos de azúcar unidos a N presentes solamente en la porción Fc de los conjugados. Además, varias técnicas y protocolos de marcado directo son compatibles con la presente descripción. Por ejemplo, los polipéptidos marcados con tecnecio-99m pueden prepararse por procedimientos de intercambio de ligandos, reduciendo pertecnato (TcO_4^-) con disolución de iones de estaño, quelando el tecnecio reducido en una columna Sephadex y aplicando los polipéptidos a esta columna, o por técnicas de marcado en lote, p. ej., incubando pertecnato, un agente reductor tal como SnCl_2 , una disolución tampón tal como disolución de ftalato de sodio-potasio y los anticuerpos. En cualquier caso, los radionúclidos preferidos para anticuerpos de marcado directo se conocen en la técnica, y un radionúclido particularmente preferido para marcado directo es ^{131}I covalentemente unido mediante residuos tirosina. Los polipéptidos de acuerdo con la descripción pueden derivarse, por ejemplo, con yoduro de sodio o potasio radiactivo y un agente oxidante químico, tal como hipoclorito, cloramina T o similar, o un agente enzimático oxidante, tal como lactoperoxidasa, glucosa oxidasa y glucosa. No obstante, para los fines de la presente descripción, el planteamiento de marcado indirecto se prefiere particularmente. Las patentes relacionadas con quelantes y conjugados quelantes se conocen en la técnica. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4.831.175 de Gansow se refiere a quelatos de ácido dietilentriaminapentaacético sustituidos y a conjugados de proteínas que los contienen, y a métodos para su preparación. Las patentes de Estados Unidos núm. 5.099.069, 5.246.692, 5.286.850, 5.434.287 y 5.124.471 de Gansow también se refieren a quelatos de DTPA polisustituidos. Otros ejemplos de quelantes de metales compatibles son ácido etilendimetiltetraacético (EDTA), ácido dietiltrieminapentaacético (DPTA), 1,4,8,11-tetraazatetradecano, ácido 1,4,8,11-tetraazatetradecano-1,4,8,11-tetraacético, ácido 1-oxa-4,7,12,15-tetraazaheptadecano-4,7,12,15-tetraacético o similar. Se prefiere particularmente ciclohexil-DTPA o CHX-DTPA y se ejemplifica ampliamente a continuación. El experto en la técnica puede discernir fácilmente incluso otros quelantes compatibles, incluidos aquellos aún por descubrir, y están claramente dentro del alcance de la presente descripción.

Los quelantes compatibles, incluido el quelante bifuncional específico utilizado para facilitar la quelación en las patentes de Estados Unidos 6.682.734, 6.399.061 y 5.843.439, se seleccionan preferiblemente para proveer gran afinidad hacia metales trivalentes, exhibir mayores relaciones tumor a no tumor y menor absorción ósea, como también mayor retención *in vivo* del radionúclido en sitios diana, es decir, sitios de tumores linfoma de células B. No obstante, otros quelantes bifuncionales que pueden o no poseer todas estas características se conocen en la técnica y pueden también ser beneficiosos en la terapia de tumores.

Se ha de apreciar que, de acuerdo con las descripciones de este documento, los polipéptidos pueden conjugarse a diferentes radiomarcas para propósitos diagnósticos y terapéuticos. Con este fin, la patente de Estados Unidos anteriormente mencionada describe conjugados terapéuticos radiomarcados para "diagnóstico por imágenes" de tumores antes de la administración del anticuerpo terapéutico. El conjugado "In2B8" comprende un anticuerpo monoclonal murino, 268, específico para el antígeno CD20 humano, unido a ^{111}In vía un quelante bifuncional, es decir, MX-DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético), que comprende una mezcla 1:1 de 1-isotiocianatobencil-3-metil-DTPA y 1-metil-3-isotiocianatobencil-DTPA. ^{111}In es este radionúclido particularmente preferido como radionúclido diagnóstico entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mCi pueden administrarse de modo seguro sin toxicidad detectable; y los datos de las imágenes en general son predictivos de la distribución subsiguiente del anticuerpo marcado con ^{90}Y . La mayoría de los estudios por imágenes utilizan 5 mCi de anticuerpo marcado con ^{111}In , ya que esta dosis es segura y más eficaz que dosis inferiores, y las imágenes óptimas se obtienen tres a seis días después de la administración del anticuerpo. Véanse, por ejemplo, Murray, J, Nuc. Med. 26:3328 (1985) y Carraguillo et al., J. Nuc. Med. 26:67 (1985).

Como se indicó anteriormente, una diversidad de radionúclidos son aplicables a la presente descripción, y los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente qué radionúclido es el más apropiado bajo diversas circunstancias. Por ejemplo, ^{131}I es un radionúclido conocido utilizado para inmunoterapia dirigida. No obstante, la utilidad clínica de ^{131}I puede estar limitada por varios factores que incluyen semivida física de ocho días; deshalogenación del anticuerpo yodado en la sangre y en los sitios de los tumores; y características de emisión (p. ej., gran componente gamma) que pueden ser subóptimas para deposición de dosis localizada en el tumor. Con el

advenimiento de agentes quelantes superiores, la oportunidad de unir grupos quelantes de metal a proteínas ha aumentado las oportunidades de utilizar otros radionúclidos tales como ^{111}In e ^{90}Y . ^{90}Y ofrece varios beneficios para la utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la semivida de 64 horas de ^{90}Y es lo suficientemente larga como para permitir la acumulación del anticuerpo por parte del tumor y, a diferencia por ejemplo de ^{131}I , ^{90}Y es un emisor beta puro de gran energía sin irradiación gamma que acompañe en su desintegración, con un intervalo en tejido de 100 a 1.000 diámetros de célula. A su vez, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración ambulatoria de anticuerpos marcados con ^{90}Y . Además, la internalización de anticuerpo marcado no es necesaria para destruir las células, y la emisión local de radiación ionizante debería ser letal para células tumorales que carecen de la molécula diana.

Los expertos en la técnica apreciarán que estos conjugados no radiactivos pueden también ensamblarse usando una diversidad de técnicas, dependiendo del agente seleccionado que se ha de conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, p. ej., haciendo reaccionar los polipéptidos con un éster activado de biotina tal como el N-hidroxisuccinimida éster de biotina. De forma similar, los conjugados con un marcador fluorescente pueden prepararse en presencia de un agente de acoplamiento, p. ej., aquellos mencionados previamente, o por reacción con un isotiocianato, preferiblemente isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los polipéptidos de la descripción con sustancias citostáticas/citotóxicas y quelatos metálicos se preparan en un modo análogo.

Muchos restos efectores carecen de grupos funcionales adecuados a los que pueden unirse los anticuerpos. En un ejemplo, un resto efector, p. ej., un fármaco o profármaco se une al anticuerpo a través de un resto de unión. En un ejemplo, el resto de unión contiene un enlace químico que permite la activación de citotoxicidad en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados se conocen en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces lábiles de ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles peptidasa, enlaces tioéter formados entre grupos sulfhidrilo y maleimida y enlaces lábiles esterasa. Más preferiblemente, el resto de unión comprende un enlace disulfuro o un enlace tioéter. De acuerdo con la descripción, el resto de unión preferiblemente comprende un grupo químico reactivo. Los grupos químicos particularmente preferidos son ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo. En un ejemplo preferido, el grupo químico reactivo puede estar covalentemente unido al efector mediante un enlace disulfuro entre los grupos tiol. En un ejemplo, una molécula efectora se modifica para comprender un grupo tiol. El experto en la técnica apreciará que un grupo tiol contiene un átomo de azufre unido a un átomo de hidrógeno y también se denomina típicamente en la técnica grupo sulfhidrilo, que puede representarse como "-SH" o "RSH."

En un ejemplo, se puede usar un resto de unión para unir el resto efector con la molécula de unión. El resto de unión de la descripción puede ser escindible o no escindible. En un ejemplo, el resto de unión escindible es un resto de unión escindible de reducción y oxidación, de modo tal que el resto de unión es escindible en entornos con un potencial de reducción y oxidación inferior, tal como el citoplasma y otras regiones con concentraciones superiores de moléculas con grupos sulfhidrilo libres. Los ejemplos de restos de unión que se pueden escindir debido a un cambio en el potencial de reducción y oxidación incluyen aquellos que contienen disulfuros. El estímulo de escisión puede ser provisto tras la absorción intracelular de la proteína de unión de la descripción, en donde el potencial de reducción y oxidación inferior del citoplasma facilita la escisión del resto de unión. En otro ejemplo, una reducción en el pH desencadena la liberación del maitansinoide en la célula diana. La reducción del pH está implicada en muchos procesos fisiológicos y patológicos, como por ejemplo tráfico de endosomas, desarrollo de tumores, inflamación e isquemia de miocardio. El pH cae de un 7,4 fisiológico a 5-6 en endosomas o 4-5 en lisosomas. Los ejemplos de restos de unión sensibles a ácido que se pueden emplear para dirigir lisosomas o endosomas de células de cáncer incluyen aquellos con enlaces escindibles con ácido tales como aquellos que se hallan en acetales, cetales, ortoésteres, hidrazonas, tritilos, cis-aconitilos o tiocarbamoilos (véanse, por ejemplo, Willner et al., (1993), *Bioconj. Chem.*, 4:521-7; patentes de Estados Unidos núm. 4.569.789, 4.631.190, 5.306.809 y 5.665.358). Otros restos de unión sensibles a ácido ilustrativos comprenden secuencias de dipéptidos Phe-Lys y Val-Lys (King et al., (2002), *J. Med. Chem.*, 45:4336-43). El estímulo de escisión puede ser provisto tras el tráfico de absorción intracelular hasta compartimientos de endosomas de pH bajo (p. ej., lisosomas). Otros restos de unión escindibles con ácido ilustrativos son los restos que contienen dos o más enlaces escindibles con ácido para unión de dos o más maitansinoides (King et al., (1999), *Bioconj. Chem.*, 10:279-88; documento WO 98/19705).

Los restos de unión escindibles pueden ser sensibles a agentes de escisión provistos biológicamente que se asocian con una célula diana particular, por ejemplo, enzimas de lisosomas o asociadas al tumor. Los ejemplos de restos de unión que pueden escindirse enzimáticamente incluyen, aunque sin limitarse a ello, péptidos y ésteres. Los restos de unión escindibles a enzimas ilustrativos incluyen aquellos que son sensibles a proteasas asociadas a tumores, tales como Catepsina B o plasmina (Dubowchik et al., (1999), *Pharm. Ther.*, 83:67-123; Dubowchik et al., (1998), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8:3341-52; de Groot et al., (2000), *J. Med. Chem.*, 43:3093-102; de Groot et al., (1999) *m* 42:5277-83). Los sitios escindibles de Catepsina B incluyen secuencias dipeptídicas valina-citrulina y fenilalanina-lisina (Doronina et al., (2003), *Nat. Biotech.*, 21(7): 778-84); Dubowchik et al., (2002), *Bioconj. Chem.*, 13:855-69). Otros sitios escindibles de enzimas ilustrativos incluyen aquellos formados por secuencias de oligopéptidos de 4 a 16 aminoácidos (p.ej., Suc- β -Ala-Leu-Ala-Leu) que son reconocidas por proteasas *trouse* tales como Thimet Oligopeptidasa (TOP), una enzima que es preferencialmente liberada por neutrófilos, macrófagos y otros granulocitos.

En otro ejemplo, el resto de unión se forma haciendo reaccionar una molécula de unión de la descripción con una molécula de unión de la fórmula:

X-Y-Z

en donde:

5 X es un resto de sujeción;

Y es un resto espaciador, y

Z es un resto de sujeción efector.

La expresión "resto de sujeción a la molécula de unión" incluye restos que permiten la unión covalente del enlazador a una molécula de unión de la descripción.

10 El resto de sujeción puede comprender, por ejemplo, una cadena covalente de 1-60 átomos de carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, opcionalmente sustituidos con átomos de hidrógeno y otros sustituyentes que permiten que la molécula de unión realice su función. El resto de sujeción puede comprender grupos funcionales de péptido, éster, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, éter, tioéter, etc. Preferiblemente, el resto de sujeción se selecciona de modo tal que es capaz de reaccionar con un grupo funcional reactivo en un polipéptido que comprende por lo menos un sitio de unión al antígeno, para formar una molécula de unión de la descripción. Los ejemplos de restos de sujeción incluyen, por ejemplo, restos de sujeción de amino, carboxilato y tiol.

Los restos de sujeción de amino incluyen restos que reaccionan con grupos amino en un polipéptido, de modo tal que se forma una molécula de unión de la descripción. Los restos de sujeción de amino se conocen en la técnica. Los ejemplos de restos de sujeción de amino incluyen carbamidas activadas (p. ej., que pueden reaccionar con un grupo amino en una molécula de unión para formar un resto de unión que comprenda un grupo urea), aldehídos (p. ej., que pueden reaccionar con grupos amino en una molécula de unión) e isocianatos activados (que pueden reaccionar con un grupo amino en una molécula de unión para formar un resto de unión que comprenda un grupo urea). Los ejemplos de restos de unión amino incluyen, aunque sin limitarse a ello, restos N-succinimidilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfotalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo o 3-carboxi-4-nitrofenilo.

Los restos de sujeción de carboxilato incluyen restos que reaccionan con grupos carboxilato en un polipéptido, de forma tal que se forma una molécula de unión de la descripción. Los restos de sujeción de carboxilato se conocen en la técnica. Los ejemplos de restos de sujeción de carboxilato incluyen, aunque sin limitarse a ello, intermedios de éster e intermedios de carbonilo activado, que pueden reaccionar con un grupo COOH en una molécula de unión para formar un resto de unión que comprenda un grupo éster, tioéster o amida.

Los restos de sujeción de tiol incluyen restos que reaccionan con grupos tiol presentes en un polipéptido, de modo tal que se forma una molécula de unión de la descripción. Los restos de sujeción de tiol se conocen en la técnica. Los ejemplos de restos de sujeción de tiol incluyen grupos acilo activados (que pueden reaccionar con un sulfhidrilo en una molécula de unión para formar un resto de unión que comprenda un tioéster), grupos alquilo activados (que pueden reaccionar con un sulfhidrilo en una molécula de unión para formar un resto de unión que comprenda un resto tioéter), aceptores Michael tales como grupos de maleimida o acrílicos (que pueden reaccionar con un sulfhidrilo en una molécula de unión para formar un producto de adición de tipo Michael), grupos que reaccionan con grupos sulfhidrilo mediante reacciones de reducción y oxidación, grupos disulfuro activados (que pueden reaccionar con un grupo sulfhidrilo en una molécula de unión para formar, por ejemplo, un resto de unión que comprende un resto disulfuro). Otros restos de sujeción de tiol incluyen compuestos de acrilamida, alfa-yodoacetamidas y ciclopropan-1,1-dicarbonilo. A su vez, el resto de sujeción de tiol puede comprender un resto que modifique un tiol en la molécula de unión para formar otra especie reactiva a la que puede unirse la molécula para formar una molécula de unión de la descripción.

El resto espaciador, Y, es un enlace covalente o una cadena covalente de átomos que puede contener uno o más residuos de aminoácidos. También puede comprender 0-60 átomos de carbono, oxígeno, azufre o nitrógeno, opcionalmente sustituidos con hidrógeno u otros sustituyentes que permiten que la molécula de unión resultante cumpla su función. En un ejemplo, Y comprende un resto alquilo, alquenilo, alquinilo, éster, éter, carbonilo o amida.

En otro ejemplo, un grupo tiol en la molécula de unión se convierte a un grupo reactivo, tal como un grupo carbonilo reactivo, tal como una cetona o aldehído. El resto de sujeción se hace reaccionar luego con la cetona o el aldehído para formar el compuesto deseado de la descripción. Los ejemplos de restos de sujeción reactivos de carbonilo incluyen, aunque sin limitarse a ello, hidrazinas, hidroxilaminas O-sustituidas, cetonas alfa-beta-insaturadas y $H_2C=CH-CO-NH-NH_2$. Otros ejemplos de restos de sujeción y métodos para modificar restos tioles que pueden usarse para formar las moléculas de unión de la descripción se describen en Pratt, M. L. et al. J Am Chem Soc. mayo 2003 21;125(20):6149-59; y Saxon, E. Science. 2000 Mar 17; 287(5460):2007-10.

La molécula de unión puede ser cualquier molécula capaz de reaccionar con un resto efector o su derivado para formar una molécula de unión de la descripción. Por ejemplo, el resto efector puede estar unido al resto de las porciones de la molécula a través de un enlace disulfuro. En dichos casos, el resto de unión se selecciona de modo tal que es capaz de reaccionar con un derivado de un resto efector apropiado de modo tal que el resto efector se una a la molécula de unión de la descripción. Como se describió anteriormente, el resto de unión y/o el enlazador como un todo pueden seleccionarse de manera tal que el enlazador se escinda en un entorno apropiado.

Las moléculas enlazadoras particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (véase, p. ej., Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173.723-737 (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridildihio)butanoato (SPDB) (véase, p. ej., patente de Estados Unidos núm. 4.563.304), N-succinimidilo 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) (véase, p. ej., número de registro CAS 341498-08-6), N-succinimidilo 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (véase, p. ej., Yoshitake et al., *Eur. J. Biochem.*, 101,395-399 (1979)) y N-succinimidil 4-metil-4-[2-(5-nitro-piridil)-ditio]pentanoato (SMNP) (véase, p. ej., patente de Estados Unidos núm. 4.563.304). Las moléculas enlazadoras más preferidas para uso en la composición de la invención son SPP, SMCC y SPDB. En un ejemplo preferido, SPDB se usa para enlazar un resto efector a una molécula de unión de la descripción.

Los restos efectores citotóxicos preferidos para uso en la presente descripción son fármacos citotóxicos, particularmente aquellos que se utilizan para terapia de cáncer. Tal como se emplea en esta memoria, "una citotoxina o agente citotóxico" significa cualquier agente que es perjudicial para el desarrollo y la proliferación de células y que puede actuar para reducir, inhibir o destruir una célula o tumor maligno. Las citotoxinas ilustrativas incluyen, aunque sin limitarse a ello, radionúclidos, biotoxinas, toxinas enzimáticamente activas, agentes terapéuticos citostáticos o citotóxicos, profármacos, ligandos inmunológicamente activos y modificadores de respuesta biológica tales como citocinas. Cualquier citotoxina que actúe para retardar o demorar el desarrollo de células inmunorreactivas o células malignas está dentro del alcance de la presente descripción.

Las citotoxinas ilustrativas incluyen, en general, agentes citostáticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes anti-proliferativos, agentes de unión de tubulina, hormonas y antagonistas de hormonas, y similares. Los agentes citostáticos ilustrativos que son compatibles con la presente descripción incluyen sustancias alquilantes tales como mecloroetamina, trietilenofosforamida, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán o triaziquinona, también compuestos de nitrosourea, como carmustina, lomustina o semustina.

Los restos particularmente preferidos para conjugación son maitansinoides. Los maitansinoides se aislaron originalmente del arbusto del este de África perteneciente al género *Maytenus*, pero posteriormente se descubrió que eran metabolitos de bacterias de la suciedad, como *Actinosynnema pretiosura* (véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 3.896.111). Los maitansinoides se conocen en la técnica e incluyen maitansina, maitansinol, ésteres C-3 de maitansinol y otros análogos y derivados de maitansinol (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses núm. 5.208.020 y 6.441.163). Los ésteres C-3 de maitansinol pueden ser derivados naturales o sintéticos. Asimismo, tanto los ésteres de maitansinol C-3 naturales como los sintéticos pueden clasificarse en éster C-3 con ácidos carboxílicos simples o en éster C-3 con derivados de N-metil-L-alanina, donde este último es más citotóxico que el primero. Los análogos de maitansinoides sintéticos también se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Kupchan et al., *J. Med. Chem.*, 21, 31-37 (1978). Los métodos para generar maitansinol y sus análogos y derivados se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4.151.042.

Los maitansinoides adecuados para uso como conjugados de anticuerpos pueden aislarse de fuentes naturales, producirse sintéticamente o producirse semi-sintéticamente utilizando métodos conocidos en la técnica. Además, el maitansinoide puede modificarse en cualquier modo adecuado, siempre y cuando se conserve una citotoxicidad suficiente en la molécula del conjugado final.

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un resto de unión que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos, en los que el resto de unión contiene un enlace disulfuro y sus análogos, en los que el resto de unión contiene un enlace disulfuro y el resto de sujeción comprende un éster N-succinimidilo o N-sulfosuccinimidilo. Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para enlazar químicamente el resto de unión, p. ej., a través de un resto de sujeción efector. Por ejemplo, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo son todas útiles. El resto de unión preferiblemente está unido a la posición C-3 de maitansinol. Más preferiblemente, el maitansinoide utilizado en relación con la composición inventiva es N.sup.2'-desacetil-N.sup.2'-(-3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N.sup.2'-desacetil-N.sup.2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4).

Los restos de unión con otros enlaces químicos también pueden utilizarse en el contexto de la descripción, como también otros maitansinoides. Los ejemplos específicos de otros enlaces químicos que pueden incorporarse a los restos de unión incluyen aquellos anteriormente descritos, como por ejemplo enlaces lábiles de ácido, enlaces de tioéter, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de peptidasa y enlaces lábiles de esterasa. Los métodos para producir

maitansinoides con restos de unión y/o restos de sujeción efectores se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núm. 5.208.020, 5.416.064 y 6.333.410.

5 El resto de unión (y/o el resto de sujeción efector) de un maitansinoide típica y preferiblemente es parte de una molécula enlazadora más grande que se utiliza para unir el anticuerpo al maitansinoide. Se puede emplear cualquier molécula enlazadora adecuada en relación con la descripción, siempre y cuando la molécula enlazadora provea retención de la citotoxicidad y de las características del maitansinoide y el anticuerpo, respectivamente. La molécula enlazadora une el maitansinoide con el anticuerpo a través de enlaces químicos (como se describió anteriormente), de modo tal que el maitansinoide y el anticuerpo se acoplan químicamente (p. ej., se unen covalentemente) uno con el otro. Es conveniente que la molécula enlazadora acople químicamente el maitansinoide al anticuerpo a través de 10 enlaces disulfuro o enlaces tioéter. Más preferiblemente, el anticuerpo se acopla químicamente al maitansinoide mediante enlaces disulfuro.

15 Otras clases preferidas de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, la familia de fármacos antraciclina, los fármacos vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos de pteridina, diinenos y las podofilotoxinas. Los miembros particularmente útiles de estas clases incluyen, por ejemplo, adriamicina, carminomicina, daunorrubicina (daunomicina), doxorubicina, aminopterina, metotrexato, metopterina, mitramicina, estreptonigrina, diclorometotrexato, mitomicina C, actinomicina D, porfiromicina, 5-fluorouracilo, floxuridina, ftoafur, 6-mercaptopurina, citarabina, citosina arabinósido, podofilotoxina o derivados de podofilotoxina tales como fosfato de etopósido, melfalán, vinblastina, vincristina, leurosídina, vindesina, leurosina y similares. Incluso otras citotoxinas que son compatibles con las descripciones de este documento incluyen taxol, taxano, 20 citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, tenopósido, colquicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos. Las hormonas y antagonistas de hormonas tales como corticosteroides, p. ej., prednisona, progestinas, p. ej., hidroxiprogesterona o medroprogesterona, estrógenos, p. ej., dietilstilbestrol, antiestrógenos, p. ej., tamoxifeno, andrógenos, p. ej., testosterona, e inhibidores de aromatasas, p. ej., aminoglutetimidina son también compatibles con las descripciones del presente documento. Como se observó anteriormente, el experto en la técnica puede efectuar modificaciones químicas al compuesto deseado con el fin de preparar reacciones de ese compuesto más convenientes para los propósitos de preparar los conjugados de la descripción.

25 Un ejemplo de citotoxinas particularmente preferidas comprende miembros o derivados de la familia enediino de antibióticos anti-tumorales que incluyen caliqueamicina, esperamicinas o dinemicinas. Estas toxinas son extremadamente potentes y actúan escindiendo DNA nuclear, conduciendo a muerte celular. A diferencia de las toxinas de proteínas que pueden escindirse *in vivo* para dar muchos fragmentos de polipéptidos inactivos pero inmunogénicos, las toxinas tales como caliqueamicina, esperamicinas y otras enediinos son pequeñas moléculas esencialmente no inmunogénicas. Estas toxinas no peptídicas se unen químicamente a dímeros o tetrámeros por técnicas que ya se han utilizado antes para marcar anticuerpos monoclonales y otras moléculas. Estas tecnologías 30 de unión incluyen enlaces específicos del sitio mediante los residuos de azúcar unidos en N presentes solamente en la porción Fc de los constructos. Dichos métodos de unión dirigida al sitio tienen la ventaja de reducir posibles efectos de enlace en las propiedades de un de los constructos.

35 Entre otras citotoxinas, se ha de apreciar que los polipéptidos pueden también asociarse con una biotoxina tal como la subunidad de ricina A, abrina, toxina de difteria, botulinia, cianginosinas, saxitoxina, shigatoxina, tétano, tetrodotoxina, tricoteceno, verrucologen o una enzima tóxica. Preferiblemente, dichos constructos se realizarán usando técnicas de ingeniería genética que permiten la expresión directa del constructo anticuerpo-toxina. Otros modificadores de la respuesta biológica que pueden asociarse con los polipéptidos de la descripción comprenden citocinas tales como linfocinas e interferones. En vista de la presente descripción, se entiende que el experto en la técnica podría formar fácilmente los constructos utilizando técnicas convencionales.

40 Otra clase de citotoxinas compatibles que se puede utilizar junto con los polipéptidos descritos son fármacos radiosensibilizantes que pueden dirigirse eficazmente al tumor o a las células inmunorreactivas. Dichos fármacos potencian la sensibilidad a la radiación ionizante, aumentando así la eficacia de la radioterapia. Un conjugado de anticuerpo internalizado por la célula tumoral enviaría el radiosensibilizador más cercano al núcleo, en donde la radiosensibilización sería máxima. Los polipéptidos de la descripción unidos al radiosensibilizador no ligado se aclararían rápidamente de la sangre, localizando el resto del agente de radiosensibilización en el tumor diana y proporcionando absorción mínima en tejidos normales. Después del rápido aclaramiento de la sangre, la radioterapia complementaria se administraría en una de tres maneras: 1.) radiación de haz externo dirigida específicamente al tumor, 2.) radiactividad directamente implantada en el tumor o 3.) radioinmunoterapia sistémica con el mismo anticuerpo. Una variación potencialmente atractiva de este planteamiento sería la unión de un radioisótopo 45 terapéutico al inmunoconjugado radiosensibilizado, proporcionando de esta forma la comodidad de administrar al paciente un único fármaco.

50 En un ejemplo, puede conjugarse un resto que potencia la estabilidad o eficacia del polipéptido. Por ejemplo, en un caso, puede conjugarse PEG a los polipéptidos de la descripción para aumentar su semivida *in vivo*. Leong, S.R., et

al., 2001. Cytokine 16:106; 2002; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531; o Weir et al. 2002. Biochem. Soc. Transactions 30:512.

Como se mencionó precedentemente, las citotoxinas compatibles pueden comprender un profármaco. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "profármaco" se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos tóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma precursora más activa. Los profármacos compatibles con la descripción incluyen, aunque sin limitarse a ello, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse al fármaco libre citotóxico más activo. En un ejemplo, un agente citotóxico, tal como maitansinoide, se administra como profármaco que es liberado por la hidrólisis de enlaces disulfuro. Otros ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivar en una forma de profármaco para uso en la presente descripción comprenden aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

15 V. Administración de polipéptidos

Los métodos para preparar y administrar los polipéptidos de la descripción a un sujeto se conocen en la técnica o los pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica. La ruta de administración del polipéptido de la descripción puede ser oral, parenteral por inhalación o tópica. El término parenteral, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. En general se prefieren las formas intravenosa, intraarterial, subcutánea e intramuscular de administración parenteral. Si bien todas estas formas de administración se contemplan claramente como dentro del alcance de la descripción, una forma de administración sería una disolución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o por goteo. Usualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (p. ej., albúmina humana), etc. No obstante, en otros métodos compatibles con las descripciones del presente documento, los polipéptidos pueden administrarse directamente al sitio de la población celular adversa, aumentando así la exposición del tejido patológico al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como etiloleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo disolución salina y medio tampón. En la presente descripción, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitarse a ello, tampón de fosfato 0,01-0,1M y preferiblemente 0,05M o disolución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, disolución de Ringer lactada, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen repositorios de fluido y nutrientes, repositorios de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer y similares. Los conservantes y otros aditivos pueden también estar presentes, como por ejemplo antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (si son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida al grado de que exista una fácil posibilidad de uso de la jeringa. Deberá ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferiblemente se conservará contra la acción de microorganismos contaminantes, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez correcta puede mantenerse, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento tal como lecitina, con el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y con el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, preferiblemente incluirá agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede obtenerse incluyendo en la composición un agente que demore la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando un compuesto activo (p. ej., un polipéptido propiamente dicho o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes mencionados en este documento, según se requiera, con posterior esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos entre aquellos mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización, que produce un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de su disolución estéril previamente filtrada. Las

preparaciones para inyección se procesan, se rellenan en recipientes tales como ampollas, bolsas, frascos, jeringas y viales, y se sellan bajo condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y comercializarse en la forma de un kit. Dichos artículos de fabricación preferiblemente contendrán etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o tiene predisposición a trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente descripción para el tratamiento de las enfermedades anteriormente descritas varía dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, incluidos mamíferos transgénicos. Las dosis del tratamiento pueden titularse usando métodos de rutina conocidos por el experto en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosis puede oscilar, p. ej., entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más usualmente entre 0,01 y 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedante. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente por lo menos 1 mg/kg. Dosis intermedias en los intervalos anteriormente expuestos también tienen como fin estar dentro del alcance de la descripción.

Los sujetos pueden recibir dichas dosis diariamente, día por medio, semanalmente o según cualquier esquema determinado por análisis empírico. Un tratamiento ilustrativo comprende la administración en múltiples dosis durante un periodo prolongado, por ejemplo, de por lo menos seis meses. Regímenes de tratamiento ilustrativos adicionales comprenden la administración una vez cada 15 días o una vez por mes o una vez cada 3 o seis meses. Los esquemas de dosificación ilustrativos incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg día por medio o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con distintas especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado puede estar dentro de los intervalos indicados.

Las moléculas de unión de la descripción pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, p. ej., diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique midiendo los niveles en sangre de polipéptido o molécula diana en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración determinada de toxina o molécula de unión en el plasma, p. ej., 1-1000 µg/ml o 25-300 µg/ml. Alternativamente, las moléculas de unión pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se necesita una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados indican la semivida más prolongada, seguidos por anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. En un ejemplo, las moléculas de unión de la descripción pueden administrarse en forma no conjugada. En otro ejemplo, los polipéptidos de la descripción pueden administrarse en múltiples veces en forma conjugada. Incluso en otro caso, las moléculas de anticuerpo de la descripción pueden administrarse en forma no conjugada, luego en forma conjugada, o viceversa.

La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que todavía no se encuentra en estado patológico para potenciar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como "dosis eficaz profiláctica". En este uso, las cantidades precisas nuevamente dependen del estado de salud y de la inmunidad general del paciente, pero en general oscilan entre 0,1 y 25 mg por dosis, especialmente 0,5 a 2,5 mg por dosis. Una dosis relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta (p. ej., entre aproximadamente 1 y 400 mg/kg de molécula de unión, p. ej., anticuerpo por dosis, donde las dosis de 5 a 25 mg se emplean más comúnmente para radioinmunoconjugados y dosis superiores para moléculas conjugadas a fármacos de citotoxina) en intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o finaliza el avance de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente exhibe alivio parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. De allí en más, el paciente puede recibir un régimen profiláctico.

En un ejemplo, un sujeto puede tratarse con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la descripción (p. ej., en un vector). Las dosis para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos oscilan entre aproximadamente 10 ng y 1 g, 100 µg y 100 mg, 1 µg y 10 mg, o 30-300 µg DNA por paciente. Las dosis para vectores víricos infecciosos varían entre 10-100 o más viriones por dosis.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse por los medios parenteral, tópico, intravenoso, oral, subcutáneo, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Se prefiere la inyección intramuscular o la infusión intravenosa para administración del anticuerpo. En algunos métodos, los anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como el dispositivo MedipadTM.

Los agentes de la descripción pueden opcionalmente administrarse en combinación con otros agentes que son eficaces para tratar el trastorno o la afección por la cual se necesita tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico). Los agentes adicionales que se prefieren son aquellos reconocidos en la técnica y administrados convencionalmente para un trastorno particular.

Las dosis de tratamiento individuales eficaces (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de polipéptidos marcados con ⁹⁰Y de la descripción oscilan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. El tratamiento individual eficaz de dosis ablativas no de médula ósea de anticuerpos marcados con ¹³¹I oscilan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis ablativas de tratamiento individual eficaces (es decir, se puede requerir trasplante de médula ósea autólogo) de anticuerpos marcados con ¹³¹I oscilan entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. En conjunto con un anticuerpo quimérico, debido a anticuerpos murinos vis-a-vis de semivida circulante más prolongada, las dosis ablativas no de médula de tratamiento individual eficaz con anticuerpos quiméricos marcados con yodo-131 oscilan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, más preferiblemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios para toma de imágenes para, p. ej., la etiqueta ¹¹¹In, son típicamente menos de aproximadamente 5 mCi.

Si bien se ha adquirido bastante experiencia clínica con ¹³¹I y ⁹⁰Y, se conocen en la técnica otras radiomarcas y se han utilizado para fines similares. Incluso otros radioisótopos se utilizan para obtención de imágenes. Por ejemplo, los radioisótopos adicionales que son compatibles con el alcance de la presente descripción incluyen, aunque sin limitarse a ello, ¹²³I, ¹²⁵I, ³²P, ⁵⁷Co, ⁶⁴Cu, ⁷⁷Br, ⁸¹Rb, ⁸⁷Sr, ¹²⁷Cs, ¹²⁹Cs, ¹³²I, ¹⁹⁷Hg, ²⁰³Pb, ²⁰⁶Bi, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹⁵³Sm, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁹Au, ²²⁵Ac, ²¹¹At y ²¹³Bi. En este sentido, los emisores alfa, gamma y beta son todos compatibles con la presente descripción. Además, en vista de la presente descripción, se ha de entender que el experto en la técnica podría determinar fácilmente qué radionúclidos son compatibles con un curso seleccionado de tratamiento sin experimentación indebida. A este efecto, los radionúclidos adicionales que ya se han empleado en diagnóstico clínico incluyen ¹²⁵I, ¹²³I, ⁹⁹Tc, ⁴³K, ⁵²Fe, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, como también ¹¹¹In. Los anticuerpos también se han marcado con una diversidad de radionúclidos para uso potencial en inmunoterapia dirigida (Peirersz et al. Immunol. Cell Biol. 65:111-125 (1987)). Estos radionúclidos incluyen ¹⁸⁶Re y ¹⁸⁶Re como también ¹⁹⁹Au y ⁶⁷Cu en un grado menor. La patente de Estados Unidos núm. 5.460.785 proporciona datos adicionales con respecto a dichos radioisótopos.

Ya sea que estos polipéptidos de la descripción se utilizan en forma conjugada o no conjugada, se ha de apreciar que una ventaja importante de la presente descripción es la capacidad de usar estos polipéptidos en pacientes mielosuprimidos, especialmente aquellos que se someten o se han sometido a terapias complementarias, como radioterapia o quimioterapia.

En otro ejemplo preferido, los polipéptidos (nuevamente en forma conjugada o no conjugada) se pueden usar en un régimen terapéutico combinado con agentes quimioterapéuticos. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos regímenes terapéuticos pueden comprender la administración secuencial, simultánea, concurrente o coextensiva de los anticuerpos descritos y uno o más agentes quimioterapéuticos. En un ejemplo particularmente preferido, este aspecto de la descripción comprenderá la administración de una molécula de unión conjugada a una toxina, p. ej., conjugada a un maitansinoide tal como maitansinoide D4.

Si bien los polipéptidos pueden administrarse como se describió inmediatamente arriba, debe enfatizarse que en otro caso pueden administrarse conjugados y no conjugados a pacientes sanos como agente terapéutico de primera línea. En tal caso, los polipéptidos pueden administrarse a pacientes que tienen reservas de médula ósea roja normales o promedio y/o a pacientes que no las tienen, y que no se están sometiendo a terapias complementarias tales como radiación de haz externo o quimioterapia.

Sin embargo, como se analizó anteriormente, los ejemplos seleccionados de la descripción comprenden la administración de polipéptidos a pacientes mielosuprimidos o en combinación o junto con una o más terapias complementarias tales como radioterapia o quimioterapia (es decir, un régimen terapéutico combinado). Tal como se emplea en esta memoria, la administración de polipéptidos junto con o en combinación con terapia complementaria significa la administración o la aplicación secuencial, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea de la terapia y los polipéptidos descritos. Los expertos en la técnica apreciarán que la administración o aplicación de los diversos componentes del régimen terapéutico combinado pueden sincronizarse para potenciar la eficacia general del tratamiento. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos podrían administrarse en cursos estándar de

tratamiento, conocidos, seguidos dentro de algunas semanas por radioinmunoconjugados de la presente descripción. A la inversa, los polipéptidos asociados con citotoxinas podrían administrarse por vía intravenosa seguidos de radiación de haz externo. Incluso en otro ejemplo, el polipéptido puede administrarse concurrentemente con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados en una sola visita al consultorio. El experto en la técnica (p. ej., un oncólogo experimentado) podría discernir fácilmente los regímenes terapéuticos combinados eficaces sin experimentación indebida, basados en la terapia complementaria seleccionada y en las descripciones de la presente memoria.

En este sentido, se ha de apreciar que la combinación del polipéptido (o bien conjugado o no conjugado) y el agente quimioterapéutico puede administrarse en cualquier orden y dentro de cualquier marco de tiempo que proporcione un beneficio terapéutico para el paciente. Es decir, el agente quimioterapéutico y el polipéptido pueden administrarse en cualquier orden o concurrentemente. En un ejemplo seleccionado, los polipéptidos de la presente descripción se administrarán a pacientes que se han sometido previamente a quimioterapia. Incluso en otro ejemplo, los polipéptidos y el tratamiento quimioterapéutico se administrarán sustancialmente en forma simultánea o concurrente. Por ejemplo, el paciente puede recibir la molécula de unión mientras se somete a un curso de quimioterapia. En un ejemplo preferido, la molécula de unión se administrará dentro de 1 año de cualquier agente o tratamiento quimioterapéutico, el polipéptido se administrará dentro de 10, 8, 6, 4 o 2 meses del agente o tratamiento quimioterapéutico. Incluso en otro ejemplo preferido, el polipéptido se administrará dentro de 4, 3, 2 o 1 semana de cualquier agente o tratamiento quimioterapéutico. Incluso en otro ejemplo, el polipéptido se administrará dentro de 5, 4, 3, 2 o 1 días del agente o tratamiento quimioterapéutico seleccionado. Se ha de entender también que los dos agentes o tratamientos se administrarán al paciente al cabo de horas o minutos (es decir, prácticamente en forma simultánea).

Además, de acuerdo con la presente descripción, un paciente mielosuprimido significa cualquier paciente que exhibe recuentos de sangre reducidos. Los expertos en la técnica apreciarán que hay varios parámetros de recuento sanguíneo convencionalmente utilizados como indicadores clínicos de mielosupresión y uno puede medir fácilmente el grado en el que ocurre la mielosupresión en un paciente. Los ejemplos de medición de mielosupresión aceptados en la técnica son el recuento absoluto de neutrófilos (ANC) o recuento de plaquetas. Dicha mielosupresión o mieloablación parcial puede ser el resultado de diversos trastornos o enfermedades bioquímicas, o más probablemente, el resultado de quimioterapia o radioterapia anterior. En este sentido, los expertos en la técnica apreciarán que los pacientes que se han sometido a quimioterapia tradicional típicamente exhibirán reservas de médula ósea roja reducidas. Como se analizó anteriormente, dichos sujetos con frecuencia no pueden tratarse usando niveles óptimos de citotoxina (es decir, radionúclidos) debido a efectos colaterales inaceptables tales como anemia o inmunosupresión que producen mayor morbimortalidad.

Más específicamente, los polipéptidos conjugados o no conjugados de la presente descripción se pueden usar para tratar eficazmente a pacientes que tienen ANC inferiores a aproximadamente $2000/\text{mm}^3$ o recuentos de plaquetas inferiores a aproximadamente $150.000/\text{mm}^3$. Más preferiblemente, los polipéptidos de la presente descripción pueden utilizarse para tratar a pacientes que tienen ANC inferiores a aproximadamente $1500/\text{mm}^3$, inferiores a aproximadamente $1000/\text{mm}^3$ o incluso más preferiblemente inferiores a aproximadamente $500/\text{mm}^3$. De modo similar, los polipéptidos de la presente descripción se pueden utilizar para tratar a pacientes que tienen un recuento de plaquetas inferior a aproximadamente $75.000/\text{mm}^3$, inferior a aproximadamente $50.000/\text{mm}^3$ o incluso inferior a aproximadamente $10.000/\text{mm}^3$. En un sentido más general, los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente cuándo un paciente se encuentra mielosuprimido, usando pautas y procedimientos implementados por el gobierno.

Como se indicó anteriormente, muchos pacientes mielosuprimidos se han sometido a cursos de tratamiento que incluyen quimioterapia, radioterapia de implante o radioterapia de haz externo. En este último caso, una fuente de radiación externa es para irradiación local de un tumor maligno. Para métodos de implantación de radioterapia, los reactivos radiactivos se colocan quirúrgicamente dentro de la neoplasia, irradiando así selectivamente el sitio de la enfermedad. En cualquier caso, los polipéptidos descritos pueden usarse para tratar trastornos en pacientes que exhiben mielosupresión independientemente de la causa.

En este sentido, se ha de apreciar que los polipéptidos de la presente descripción pueden usarse junto con o en combinación con cualquier agente o agentes quimioterapéuticos (p. ej., para proveer un régimen terapéutico combinado) que elimine, reduzca, inhiba o controle el crecimiento de células neoplásicas *in vivo*. Como se analizó, dichos agentes con frecuencia producen la reducción de reservas de médula ósea roja. Esta reducción puede compensarse, en todo o en parte, por la mielotoxicidad reducida de los compuestos de la presente que ventajosamente permiten el tratamiento agresivo de neoplasias en dichos pacientes. En otro ejemplo preferido, los inmunoconjugados radiomarcados descritos en esta memoria pueden utilizarse de manera eficaz con radiosensibilizantes que incrementan la susceptibilidad de las células neoplásicas a los radionúclidos. Por ejemplo, los compuestos radiosensibilizantes pueden administrarse después de que la molécula de unión radiomarcada ha sido en gran medida aclarada del torrente circulatorio pero todavía permanece a niveles terapéuticamente eficaces en el sitio del tumor o tumores.

Con respecto a estos aspectos de la descripción, los agentes quimioterapéuticos ilustrativos compatibles con la presente descripción incluyen agentes alquilantes, vinca alcaloides (p. ej., vincristina y vinblastina), procarbazona, metotrexato y prednisona. La combinación de cuatro fármacos MOPP (mecletamina (mostaza de nitrógeno), vincristina (Oncovin), procarbazona y prednisona) es muy eficaz para tratar diversos tipos de linfoma y comprende un ejemplo preferido de la presente descripción. En pacientes resistentes a MOPP, se pueden utilizar combinaciones de ABVD (p. ej., adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona y prednisona), CABS (lomustina, doxorubicina, bleomicina y estreptoizotocina), MOPP más ABVD, MOPP más ABV (doxorubicina, bleomicina y vinblastina) o BCVPP (carmustina, ciclofosfamida, vinblastina, procarbazona y prednisona). Arnold S. Freedman y Lee M. Nadler, Malignant Lymphomas, en HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al., eds., 13^a ed. 1994) y V. T. DeVita et al., (1997) y las referencias allí citadas para dosificación y esquemas estándar. Estas terapias pueden utilizarse inalteradas, o alteradas según sea necesario para un paciente particular, en combinación con uno o más polipéptidos de la descripción como se describe en esta memoria.

Los regímenes adicionales que son útiles en el contexto de la presente descripción incluyen el uso de agentes alquilantes individuales tales como ciclofosfamida o clorambucilo o combinaciones tales como CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP (CVP y doxorubicina), C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona y procarbazona), CAP-BOP (CHOP más procarbazona y bleomicina), m-BACOD (CHOP más metotrexato, bleomicina y leucovorina), ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido y leucovorina más MOPP estándar), ProMACE-CytaBOM (prednisona, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexato y leucovorina) y MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona de dosis fija, bleomicina y leucovorina). Los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente las dosis y esquemas estándar para cada uno de estos regímenes. CHOP también se ha combinado con bleomicina, metotrexato, procarbazona, mostaza de nitrógeno, citosina arabinósido y etopósido. Otros agentes quimioterapéuticos compatibles incluyen, aunque sin limitarse a ello, 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA), 2'-desoxicoformicina y fludarabina.

Para pacientes con NHL de grado intermedio y alto, que no logran la remisión o el relapso, se utiliza la terapia de rescate. Las terapias de rescate emplean fármacos tales como citocina arabinosida, cisplatino, etopósido e ifosfamida solos o combinados. En las formas de relapso o agresivas de ciertos trastornos neoplásicos, a menudo se utilizan los siguientes protocolos: IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido), MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato y etopósido), DHAP (dexametasona, citarabina y cisplatino en altas dosis), ESHAP (etopósido, metilprednisolona, HD citarabina, cisplatino), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina) y CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona) cada uno con índices de dosis y regímenes conocidos.

La cantidad del agente terapéutico que se ha de utilizar en combinación con los polipéptidos de la presente descripción puede variar por sujeto o puede administrarse de acuerdo con lo que se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Bruce A Chabner et al., Antineoplastic Agents, en GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 ((Joel G. Hardman et al., eds., 9^a ed. 1996).

En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción puede administrarse a un sujeto que se ha sometido, se está sometiendo o se someterá a un procedimiento quirúrgico, p. ej., para extirpar un tumor primario, una metástasis, neoplasia o tejido precanceroso como terapia preventiva.

En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción se administra junto con un agente biológico. Los agentes biológicos útiles en el tratamiento de neoplasias se conocen en la técnica, y una molécula de unión de la descripción puede administrarse, por ejemplo, junto con dichos agentes biológicos conocidos.

Por ejemplo, la FDA ha aprobado los siguientes agentes biológicos para el tratamiento de cáncer de mama: Herceptin[®] (trastuzumab, Genentech Inc., South San Francisco, CA; un anticuerpo monoclonal humanizado que tiene actividad antitumoral en cáncer de mama HER2 positivo); Faslodex[®] (fulvestrant, AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE; un antagonista de los receptores de estrógenos utilizado para tratar cáncer de mama); Arimidex[®] (anastrozol, AstraZeneca Pharmaceuticals, LP; un inhibidor de aromatasa no esteroideo que bloquea la aromatasa, una enzima necesaria para producir estrógenos); Aromasin[®] (exemestano, Pfizer Inc., New York, NY; un inactivador irreversible de aromatasa esteroideo utilizado en el tratamiento de cáncer de mama); Femara[®] (letrozol, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ; un inhibidor de aromatasa no esteroideo aprobado por la FDA para tratar cáncer de mama); y Nolvadex[®] (tamoxifeno, AstraZeneca Pharmaceuticals, LP; un antiestrógeno no esteroideo aprobado por la FDA para tratar cáncer de mama). Otras biologías con las que las moléculas de unión de la descripción pueden combinarse incluyen: Avastin[™] (bevacizumab, Genentech Inc.; la primera terapia aprobada por la FDA diseñada para inhibir la angiogénesis); y Zevalin[®] (ibratumomab tiuxetan, Biogen Idec, Cambridge, MA; un anticuerpo monoclonal radiomarcado actualmente aprobado para el tratamiento de linfomas de células B).

Además, la FDA ha aprobado las siguientes biología para el tratamiento de cáncer colorrectal: Avastin™; Erbitux™ (cetuxirna, ImClone Systems Inc., New York, NY, y Bristol-Myers Squibb, New York, NY; es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)); Gleevec® (mesilato de imatinib; un inhibidor de proteína cinasa); y Ergamisol® (hidrocloruro de levamisol, Janssen Pharmaceutica Products, LP, Titusville, NJ; un inmunomodulador aprobado por la FDA en 1990 como tratamiento complementario en combinación con 5-fluorouracil después de la resección quirúrgica en pacientes con cáncer de colon en etapa C de Duke.

Para uso en el tratamiento de linfomas no Hodgkin, las terapias actualmente aprobadas incluyen: Bexxar® (tositumomab y yodo 1-131 tositumomab, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC; un tratamiento de múltiples etapas que implica un anticuerpo monoclonal de ratón (tositumomab) unido a una molécula radiactiva (yodo 1-131)); Intron® A (interferón alfa-2b, Schering Corporation, Kenilworth, NJ; un tipo de interferón aprobado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin folicular junto con quimioterapia combinada que contiene antraciclina (p. ej., ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona [CHOP])); Rituxan® (rituximab, Genentech Inc., South San Francisco, CA, y Biogen Idec, Cambridge, MA; un anticuerpo monoclonal aprobado para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Ontak® (denileucina diftitox, Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA; una proteína de fusión que consiste en un fragmento de toxina de difteria genéticamente condesada a interleucina 2); y Zevalin® (ibritumomab tiuxetan, Biogen Idec; un anticuerpo monoclonal radiomarcado aprobado por la FDA para el tratamiento de linfomas no Hodgkin de células B).

Para el tratamiento de leucemia, los agentes biológicos ilustrativos que se pueden utilizar en combinación con las moléculas de unión de la descripción incluyen Gleevec®, Campath®-1H (alemtuzumab, Berlex Laboratories, Richmond, CA; un tipo de anticuerpo monoclonal utilizado en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica). Además, Genasense (oblimersen, Genta Corporation, Berkley Heights, NJ); se puede utilizar una terapia antisentido BCL-2 en desarrollo para tratar la leucemia (p. ej., sola o combinada con uno o más fármacos quimioterapéuticos, como fludarabina y ciclofosfamida) junto con las moléculas de unión reivindicadas.

Para el tratamiento del cáncer de pulmón, los agentes biológicos ilustrativos incluyen Tarceva™ (erlotinib HCL, OSI Pharmaceuticals Inc., Melville, NY; una molécula pequeña diseñada para dirigir la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1 (HER1)).

Para el tratamiento de mieloma múltiple, los agentes biológicos ilustrativos incluyen Velcade® Velcade (bortezomib, Millennium Pharmaceuticals, Cambridge MA; un inhibidor de proteasoma). Los agentes biológicos adicionales incluyen Thalidomida® (talidomida, Clegene Corporation, Warren, NT; un agente inmunomodulador que parece tener múltiples acciones, incluyendo la capacidad de inhibir el crecimiento y la supervivencia de células de mieloma y antiangiogénesis).

Otros agentes biológicos ilustrativos incluyen MOAB EVIC-C225, desarrollado por InClone Systems, Inc., New York, NY.

Además, las moléculas de unión reivindicadas pueden administrarse junto con vacunas u otros agentes (p. ej., citocinas) para modular respuestas inmunitaria anticáncer. Por ejemplo, Melacine® (Corixa Corporation, Seattle, WA) es una vacuna contra tumores alogénica que se ha descrito que tiene resultados prometedores en el tratamiento de resección de melanoma T3N0M0. GMK® (Progenies Pharmaceutical Inc., Tarrytown, NY) es un antígeno de gangliósidos administrado como agente HI de fase adyuvante en pacientes que tienen recurrencia de melanoma. El fármaco terapéutico anti-gastrina Vaccine® (Apton Corporation, Miami, FL) neutraliza las hormonas G17 y glyxtened y se encuentra en ensayos clínicos de fase III para pacientes con cáncer de páncreas y estómago. CeaVac® (Titan Pharmaceuticals, Inc., South San Francisco, CA) es una vacuna de anticuerpo anti-idiotipo que se está estudiando en cáncer colorrectal. Finalmente, Theratope® (Biomira Inc., Edmonton, Alberta, Canadá) es una vacuna terapéutica de carbohidratos sintética que se está investigando como agente de fase III en pacientes con cáncer de mama metastásico (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, 2000).

En otro ejemplo, una molécula de unión de la descripción puede administrarse junto con un agente anti-angiogénesis, p. ej., Endostatin (un inhibidor específico endotelial derivado de tumor, endógeno que detiene la producción de células endoteliales microvasculares); anticuerpo anti-VEGF; los inhibidores de talidomida o metaloproteinasas de matriz inhiben la síntesis y degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos).

Como se analizó previamente, los polipéptidos de la presente descripción, sus fragmentos inmunorreactivos o recombinantes pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de trastornos mamíferos. En este sentido, se ha de apreciar que los anticuerpos descritos se formularán como para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción comprenden un vehículo estéril, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido, su fragmento inmunorreactivo o recombinante, conjugado o no conjugado a un agente terapéutico, se entenderá que significa una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a una diana y obtener un beneficio, p. ej., aliviar los síntomas de una enfermedad o trastorno o detectar

una sustancia o una célula. En el caso de células tumorales, el polipéptido preferiblemente será capaz de interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un incremento en la muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse en una o en múltiples dosis para proveer una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido.

5 Para mantener el alcance de la presente descripción, los polipéptidos de la descripción pueden administrarse a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos anteriormente mencionados de tratamiento en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos de la descripción pueden administrarse a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo de la descripción con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional de acuerdo con técnicas conocidas. El experto en la técnica ha de reconocer que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están regidos por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la ruta de administración y otras variables conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán también que un cóctel que comprenda una o más especies de los polipéptidos de acuerdo con la presente descripción puede probar ser particularmente eficaz.

15 VI. Métodos de uso

Las moléculas de la descripción se pueden usar para fines de diagnóstico o terapéuticos. El ejemplo preferido de la presente descripción proporciona compuestos, composiciones, kits y métodos para el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos, p. ej., trastornos neoplásicos, en un sujeto mamífero que necesita dicho tratamiento. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

20 Los polipéptidos de la presente descripción serán útiles en una diversidad de aplicaciones diferentes. Por ejemplo, en un caso, las moléculas de unión en cuestión pueden usarse en un ensayo para detectar Cripto *in vitro*, p. ej., usando un ensayo ELISA. Los ensayos ilustrativos se conocen en la técnica, véase, p. ej., la solicitud de Estados Unidos número 20040077025.

25 En otro ejemplo, las moléculas de unión en cuestión son útiles para detectar la presencia de células que portan Cripto utilizando tecnología de imágenes. Para dichas aplicaciones, puede ser conveniente conjugar la molécula de unión a un resto detectable, p. ej., una radiomarca, como se describe en más detalle a continuación.

En otro caso, las moléculas de unión en cuestión son útiles para reducir o eliminar células que portan la diana (p. ej., un epítipo de Cripto) reconocidas por una molécula de unión de la descripción. En otro ejemplo, las moléculas de unión en cuestión son eficaces para reducir la concentración o eliminar moléculas diana solubles en la circulación.

30 En un ejemplo, una molécula de unión de la descripción reduce el tamaño del tumor, inhibe el crecimiento del tumor y/o prolonga el tiempo de supervivencia de un sujeto que porta un tumor. Por consiguiente, esta descripción también se refiere a un método para tratar tumores en un ser humano u otro animal administrando a dicho ser humano o animal una cantidad no tóxica de un polipéptido. El experto en la técnica podría determinar, por experimentación de rutina, cuál sería una cantidad no tóxica eficaz de un polipéptido para el propósito de tratar neoplasias. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido puede variar de acuerdo con la etapa de dicha enfermedad (p. ej., etapa I frente a etapa IV), la edad, el sexo, las complicaciones médicas (p. ej., afecciones enfermedades con inmunosupresión) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo de producir una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proveer la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas pueden administrarse diariamente, o la dosis puede reducirse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. En general, no obstante, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 100 miligramos por kilo de peso corporal por día y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 10, miligramos por kilo de peso corporal por día.

35 Para fines de aclaración, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano. "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico, o a medidas preventivas. Los mamíferos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la enfermedad o el trastorno, como también aquellos en los que se va a prevenir la enfermedad o el trastorno. En consecuencia, el mamífero puede haber sido diagnosticado con la enfermedad o el trastorno, o puede estar predispuesto o susceptible a la enfermedad.

45 En general, la presente descripción puede utilizarse para tratar profiláctica o terapéuticamente cualquier neoplasia que comprenda un marcador que permita dirigir las células cancerosas mediante la molécula de unión. En un ejemplo preferido, las moléculas de unión de la descripción se utilizan para tratar tumores sólidos. Los tipos de cáncer ilustrativos que se pueden tratar incluyen, aunque sin limitarse a ello, cáncer de próstata, carcinomas gástricos tales como cáncer de colon, piel, mama, ovario, pulmón y páncreas. En otro caso, los anticuerpos de la presente descripción pueden utilizarse para tratar sarcoma de Kaposi, neoplasias CMS (hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales), melanomas, sarcomas gastrointestinales y renales,

rabdomiosarcoma, glioblastoma (preferiblemente glioblastoma multiforme), leiomiomas, retinoblastoma, cistadenocarcinoma papilar del ovario, tumor de Wilm o carcinoma pulmonar de células pequeñas. Se ha de apreciar que los polipéptidos apropiados pueden derivarse para moléculas asociadas a tumores relacionadas entre sí de las neoplasias anteriormente mencionadas sin experimentación indebida en vista de la presente descripción.

- 5 Los tumores malignos hematológicos ilustrativos que son receptivos al tratamiento con la presente descripción incluyen linfoma de Hodgkins y no Hodgkins como también leucemias, incluida ALL-L3 (leucemia de tipo Burkitt), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia de células monocíticas. Se ha de apreciar que los compuestos y métodos de la presente descripción son en particular eficaces para tratar una diversidad de linfomas de células B, incluido linfoma no Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL), linfoma celular (FCC), linfoma de células del manto (MCL),
10 linfoma difuso de células grandes (DLCL), linfoma linfocítico pequeño (SL) NHL, NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado, NHL de neoplasia maligna y macroglobulinemia de Waldenström. Debe estar claro para los expertos en la técnica que estos linfomas a menudo tendrán distintos nombres debido a cambios en los sistemas de clasificación, y los pacientes que tengan linfomas clasificados bajo distintos nombres también
15 pueden beneficiarse con los regímenes terapéuticos de la presente descripción. Además de los trastornos neoplásicos anteriormente mencionados, se apreciará que la presente descripción puede utilizarse ventajosamente para tratar otras neoplasias que porten moléculas asociadas con tumores compatibles.

En un ejemplo de la descripción, se proveen moléculas que son capaces de unirse específicamente a Cripto y que inhiben el desarrollo de células tumorales en un paciente, especialmente en donde el crecimiento del tumor es mediado por la pérdida o reducción de señalización de Activina B. En cierto ejemplo, las células tumorales son células de cerebro, cabeza, cuello, próstata, mama, testículo, colon, pulmón, ovario, vejiga, útero, cuello uterino, páncreas y estómago. En otro caso, una molécula de unión de la descripción se une específicamente a Cripto e inhibe el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan Cripto. En un caso, las células tumorales son líneas celulares que sobreexpresan Cripto, tal como las líneas celulares derivadas de neoplasias de cerebro, mama, testículo, colon, pulmón, ovario, vejiga, útero, cuello uterino, páncreas y estómago.
20
25

Esta descripción se ilustra en más detalle mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de Isoformas A y B

- 30 Las disoluciones de moléculas de anticuerpo comprenden dos isoformas distintas. Una forma, la Forma A, comprende moléculas de cadena pesada que están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro. La otra forma, la Forma B, comprende moléculas de cadena pesada que no están unidas mediante por lo menos un enlace disulfuro. La Forma B no aparece o aparece con muy baja frecuencia gamma 1 MAbs intactos, como Rituxan[®]. No obstante, con constructos que carecen del dominio (dd) que tienen una bisagra similar, la frecuencia de la Forma B es muy superior. Estas formas pueden distinguirse usando SDS-page desnaturizante, no reductora. En preparaciones de anticuerpo que carecen del dominio, la Forma A aparece como un dímero de 120kDa mientras que la Forma B aparece como un monómero de 60kDa.
35

Ejemplo 2: Identificación de heterogeneidad de la región bisagra en fragmentos de MAb que carecen del dominio CH2

- 40 Los dominios bisagra pueden subdividirse en tres regiones distintas: regiones bisagra superior, media e inferior (Roux et al. J. Immunol. 1998 161:4083). Las secuencias de polipéptidos que abarcan estas regiones para bisagras IgG1 e IgG3 se exponen en la Tabla 3. La región media de la bisagra IgG3 contiene, además de los dos residuos cisteína conservados, un motivo de 15 aminoácidos que se repite tres veces. Las secuencias de aminoácidos de estas regiones se utilizaron para diseñar péptidos conectores IgG1/IgG3 sintéticos. Éstos consistieron en residuos de bisagra superior IgG1 correspondientes a las posiciones 226 a 238, una bisagra media IgG1 correspondiente a las posiciones 239 a 241 y un motivo de repetición de bisagra superior IgG3 individual correspondiente a las posiciones 241 EE a 242 en combinación o bien con una prolina añadida en la posición 243 o con una prolina, alanina, prolina añadida en las posiciones 243, 244 y 245, respectivamente (sistema de numeración Kabat), seguida de un espaciador Gly/Ser flexible (Tabla 2). Además, los nuevos péptidos conectores diseñados consistieron en la cisteína sustituida con un residuo de aminoácidos en las posiciones 239 o 242 en combinación o bien con una prolina añadida en la posición 243 o con una prolina, alanina, prolina añadida en las posiciones 243, 244 y 245, respectivamente (sistema de numeración Kabat). También se prepararon los péptidos conectores Pro243Ala244Pro245 y Pro 243. La secuencia de aminoácidos del péptido conector CC49 humanizado que carece del dominio CH2 original que comienza en el primer residuo de la bisagra IgG1 (posición 226, sistema de numeración Kabat) hasta el último residuo del péptido conector bisagra /GlySer se indica en la Tabla 2. También se exponen diversos diseños de péptidos conectores por alineación a CC49 con las posiciones de los residuos cisteína indicadas en el sistema de numeración Kabat.
45
50
55

Tabla 2: Secuencias de péptidos conectores de región bisagra

Tabla 2	
Posición de la bisagra según Kabat:	226 227 228 229 230 232 235 236 237 238 239 240 241 241HE 241FF 241GG 241HH 241II 241JJ 241KK 241LL 241MM 241NN 241OO 241PP 241RR 241SS 242 243 244 245
Secuencia bisagra IgG1 (SEQ ID NO.:36)	E P K S C D K T H T C P P C P A P
Secuencia bisagra IgG4 (SEQ ID NO.:37V)	E S K Y G P P C P S C P A P
Secuencia bisagra media IgG3 (SEQ ID NO.:35)	C P E P K S C D T P P C P R
Péptido conector:	Secuencias de péptidos conectores
G1	E P K S C D K T H T C P P C G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:25)
G1/G3/Pro243	E P K S C D K T H T C P P C P E P K S C D T P P C P R C P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:26)
G1/G3/Pro243Ala244Pro245	E P K S C D K T H T C P P C P E P K S C D T P P C P R C P A P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:27)
G1/Cys239Ser:Pro243	E P K S C D K T H T S P P C P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:28)
G1/Cys239Ser:Pro243Ala244Pro245	E P K S C D K T H T S P P C P A P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:29)
G1/Cys242Ser:Pro243	E P K S C D K T H T C P P S P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:30)
G1/Cys242Ser:Pro243Ala244Pro245	E P K S C D K T H T C P P S P A P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:31)
G1/Pro243Ala244Pro245	E P K S C D K T H T C P P C P A P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:32)
G1/Pro243	E P K S C D K T H T C P P C P G G S S G G G S G (Sec. ID NUM:33)
G4/G3/Pro243Ala244Pro245	E S K Y G P P C P S C P E P K S C D T P P C P R C P A P (Sec. ID NUM:34)

Tabla 3: Regiones bisagra IgG1, IgG3 e IgG4

IgG	Región superior	Región media	Región inferior
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:17)	CPPCP (SEQ ID NO:18)	APELLGGP (SEQ ID NO:19)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:20)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:21)	APELLGGP (SEQ ID NO:19)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO:22)	CPSCP (SEQ ID NO:23)	APEFLGGP (SEQ ID NO:24)

Ejemplo 3. Construcción de polipéptidos y síntesis preferencial de isoformas

5 Las secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos conectores de región bisagra que se indican en la Tabla 2 se introdujeron en las secuencias del gen huCC49 que carece del dominio CH2 usando el método de Empalme por Extensión Superpuesta (SOE) (Horton, R.M. 1993 Methods in Molecular Biology, Vol 15:PCR Protocols: Current Methods and applications.. Ed. B.A. White). Las modificaciones correctas a la región bisagra se confirmaron por análisis de secuencias de DNA. Se usó DNA plasmídico para transformar células CHO DG44 para producción estable de proteína de anticuerpo.

10 Se construyeron los anticuerpos huCC49 que carecen del dominio CH2 que contienen los ocho péptidos conectores sintéticos diseñados indicados en la Tabla 2 y se produjo el anticuerpo en células CHO DG44. Se recogieron los sobrenadantes de líneas celulares aisladas, y la concentración de anticuerpo en los sobrenadantes de cultivo se determinó por inmunoensayo. Los sobrenadantes que contenían anticuerpo en el intervalo de de 0 a 30 ng de proteína de anticuerpo total de cada una de las líneas celulares se analizaron por electroforesis SDS-PAGE no reductora seguida de inmunotransferencia con anticuerpo conjugado kappa HRP anti humano para detectar las isoformas de la Forma A y de la Forma B de huCC49 que carece del dominio CH2. Bajo estas condiciones, la Forma A migra como un homodímero sencillo de 120 kDa y la Forma B como un doblete de 60 kDa. También son visibles monómeros y dímeros de cadena kappa. Se halló que todos los péptidos conectores que se indican en las SEQ ID NO: 5, 26, 32 y 33 aumentan la proporción de la forma A producida. Estos resultados indican que tanto las bisagras G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) como G1/G3/Pro243 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 26) resultaron principalmente, si no totalmente, en la producción del anticuerpo huCC49 que carece del dominio CH2 de la Forma A con poca o ninguna forma B detectable. En contraste, huCC49 que carece del dominio CH2 Cys242Ser:Pro243 (SEQ ID NO:30) y huCC49 que carece del dominio CH2 Cys242Ser:Pro243Ala244Pro245 (SEQ ID NO:32) resultaron en una preferencia moderada a importante de la isoforma de la Forma B, respectivamente.

25 Las líneas celulares que contienen los péptidos conectores Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:32) y G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) introducidos en la secuencia del anticuerpo huCC49 se usaron para producción de anticuerpos. Los péptidos conectores Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] y G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] también se introdujeron en la secuencia del anticuerpo huCC49 V2 y se generaron las líneas celulares (La secuencia de la versión 2 de CC49 humanizado se conoce en la técnica). El anticuerpo se produjo a partir de células CHO DG44 y se purificó usando los métodos descritos en el Ejemplo 4 a continuación. Las producciones de la isoforma de la Forma A después de las etapas de proteína G y HIC se indican en la Tabla 4. A partir de estos resultados, queda claro que las modificaciones introducidas en la región bisagra de anticuerpos que carecen del dominio CH2 condujo a la síntesis preferencial de la isoforma A. Siguiendo la técnica de purificación de HIC descrita en el Ejemplo 4, se obtuvo el material purificado de la Forma A HuCC49 Pro230Ala231Pro232 y HuCC49 V2 Pro230Ala231Pro232 con valores superiores a 98%. Los materiales de la Forma A HuCC49 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 y HuCC49 V2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245, purificados utilizando solamente la columna de Proteína G, se eluyeron ambos esencialmente como picos individuales a $\geq 96\%$ pureza sin más purificación de HIC. Todos los anticuerpos se examinaron por cromatografía de exclusión de tamaño y se halló que se eluían como picos individuales, lo que indica que no hubo agregación o descomposición significativa del producto del anticuerpo.

40 Se utilizó mapeo de péptidos para determinar la integridad de la formación del enlace disulfuro en las regiones bisagra de cadena pesada de los anticuerpos HuCC49 que carece del dominio CH2, HuCC49 PAP y HuCC49 G1/G3/ PAP. Las muestras de anticuerpos CC49 que carecen del dominio CH2 se desnaturalizaron, se redujeron y se digirieron con tripsina de la siguiente manera: se eluyeron alícuotas de 150ug hasta 100 ml en HPLC, agua e hidrocloreuro de guanidina desnaturalizado 6M, Tris 50mM pH 8,0. Las muestras se redujeron por adición de DTT 20 mM y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las muestras reducidas se alquilaron con ácido yodoacético 50 mM

durante 30 minutos a 37°C. La reacción de alquilación se inactivó con la adición de exceso de DTT. Las muestras reducidas y alquiladas se intercambiaron con tampón en TRIS 25 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,5 usando columnas PD-10. Se añadió tripsina a cada muestra en una relación 1:15 (p/p) y se incubó durante 4 horas a 37°C. La digestión se detuvo con la adición de ácido trifluoroacético (TFA) hasta una concentración final de 0,1%. Se analizaron luego muestras digeridas con tripsina (15 ug) de acuerdo con las condiciones cromatográficas que se describen a continuación.

Se analizaron muestras de los anticuerpos CC49 que carecen del dominio CH2 por digestión de endoproteinasa Lys-C. Se prepararon muestras desnaturalizadas y reducidas añadiendo una concentración final de guanidina HCl 4 M y DTT 25mM a 1,5 mg/ml de muestra. Se prepararon muestras no reducidas añadiendo una concentración final de guanidina HCl 4 M a 1,5 mg/ml de muestra. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se añadieron luego tampón de digestión (Tris 50 mM, pH 7,0 y 0,062 AU/ml endoproteinasa Lys-C) a las muestras a 1:1 (v/v), y las muestras se incubaron durante 15 horas a 37°C. A las 15 horas, se añadió una segunda alícuota de enzima (0,29 mAU: ug Anticuerpo) y las muestras se incubaron durante 6 horas más a 37°C. Para inactivar la reacción, se añadió TFA a una concentración final de 0,1%. Las muestras digeridas de endoproteinasa Lys-C no reducidas y reducidas (12ug) se analizaron luego de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación.

Análisis HPLC/espectrometría de masas. Las muestras se analizaron en un sistema de HPLC Agilent 1100 conectado a un espectrómetro de masas Agilent MSD de un solo cuadrupolo. Se empleó una columna C18 de fase inversa (número de catálogo Vydac 218TP52) con un sistema de eluyente de agua/TFA al 0,1% (v/v) (Tampón A) y acetonitrilo/TFA al 0,1% (v/v) (Tampón B), a un caudal de 0,2 ml/minuto. Se añadió una disolución post columna "fijativa de TFA" de acetonitrilo y ácido acético (1:1 v/v) a 0,1 ml/minuto para potenciar la ionización. La temperatura de la columna se controló a 45°C y el perfil de elución se vigiló a 215 y 280 nm. El cromatograma de iones totales se vigiló en modo km positivo. Las muestras se inyectaron en la columna y el gradiente se mantuvo a 0% Tampón B durante cinco minutos. La elución se obtuvo con un gradiente lineal de 0 a 50% Tampón B durante 125 minutos, seguido de un lavado de 75% Tampón B durante 10 minutos y un re-equilibrio con 0% Tampón B durante 30 minutos.

En el análisis reducido de endo Lys-C, no se detectó el fragmento (L52-109) en ninguna muestra. Este fragmento es muy hidrófobo y puede no haberse eluido de la matriz de la columna debido a fuertes interacciones. El correspondiente fragmento tríptico (L68-109) tampoco se detectó en ninguna muestra. Dado que estos fragmentos contienen una gran cantidad de aminoácidos, el porcentaje de identidad de los aminoácidos se redujo a ~89% de identidad. Asimismo, el fragmento (L68-119) no fue detectado en el análisis endo Lys-C de G1/G3/PAP, reduciendo la identidad a ~79%.

El análisis no reducido de endo Lys-C proporcionó resultados mucho mejores. El fragmento (L52-109) fue detectado como un enlace disulfuro con el fragmento (L1-24) en todas las muestras. Todos los otros enlaces disulfuro fueron detectados y el % de identidad total de aminoácidos fue ~99% para todas las muestras. La muestra de G1/G3/PAP exhibió un enlace disulfuro de cadena pesada adicional en el fragmento (H232-275), debajo de la región bisagra CPPC (H224-227) original. Se midieron los valores teóricos y de masas observados para los péptidos de regiones bisagra genéticamente modificados. En el péptido no reducido endo Lys-C de bisagra HuCC49ΔCH2 (residuos H221-257) se observó un PM de 7419,4, concordante con la masa calculada de 7419,4 g/mol para una bisagra enlazada que contenía puentes disulfuro entre cadenas. En el péptido no reducido de endo Lys-C de bisagra HuCC49ΔCH2 PAP (residuos H221-260) se observó un PM de 7949,7 también concordante con la masa calculada de 7949,8 g/mol para una bisagra enlazada que contenía dos puentes disulfuro entre cadenas. Los dos fragmentos de péptido no reducido bisagra fueron consecuencia de la digestión de HuCC49ΔCH2 G1/G3/ PAP por endo Lys-C debido a la presencia del residuo lisina en la posición Kabat 241II en el motivo γ3 de 15 aminoácidos. En los fragmentos peptídicos de los residuos H221-231 y H232-275 se observaron PM de 2414,3 y 8782,6 en excelente concordancia con las masas calculadas de 2413,0 y 8782,0 g/mol, respectivamente. Los datos de las masas respaldan la afirmación de que el péptido THTCPPEPK (residuos H221-231) derivado de HuCC49ΔCH2 G1/G3/PAP contiene dos puentes disulfuro entre cadenas. Cabe destacar que el péptido que comprende los residuos H232-275 contiene por lo menos un puente disulfuro entre cadenas consistente con la noción de que la bisagra G1/G3/ PAP quimérica está participando en la formación de más de dos puentes disulfuro. Estos análisis indican que la bisagra HuCC49ΔCH2 PAP forma dos enlaces disulfuro entre cadenas de cadena pesada. La bisagra HuCC49ΔCH2 G1/G3/ PAP forma por lo menos tres enlaces disulfuro entre cadenas de cadena pesada, pero posiblemente cinco. Es seguro que los residuos H232-275 del fragmento HuCC49ΔCH2 G1/G3/ PAP contienen mínimamente un enlace disulfuro entre cadenas, no obstante, no es posible discriminar las diferencias de masas en una región bisagra que contiene tres enlaces disulfuro entre cadenas de los enlaces de una que contiene un solo enlace disulfuro entre cadenas y dos enlaces disulfuro entre cadenas.

Tabla 4. Porcentaje de anticuerpo de la Forma A después de la cromatografía por afinidad (Proteína G) y después de la purificación de HIC

Anticuerpo que carece del dominio CH2	% del anticuerpo de la Forma A	
	Después de proteína G	Después de purificación HIC
HuCC49 (péptido conector SEQ ID NO:25)	60	98
HuCC49 PAP (péptido conector SEQ ID NO:32)	83	98
HuCC49 V2 PAP (péptido conector SEQ ID NO:32)	90	99
HuCC49 G1/G3/PAP (péptido conector SEQ ID NO:5)	98	Sin realizar
HuCC49 V2 G1/G3/PAP (péptido conector SEQ ID NO:5)	96	Sin realizar

Estos datos indican que los nuevos péptidos conectores de región bisagra sintética genéticamente modificados pueden utilizarse para favorecer preferencialmente la formación de las isoformas A o B. Estos estudios revelan la importancia de los residuos cisteína en la posición 242 (sistema de numeración Kabat) en la sintetización de la isoforma de la Forma A del anticuerpo que carece del dominio CH2. Por consiguiente, en un caso, un péptido conector de la descripción comprende una cisteína en por lo menos una posición 239 o 242. La sustitución de la cisteína o bien en la posición 239 o 242 con serina (p. ej., usando los péptidos conectores que se indican en las SEQ ID NO: 28, 29, 30 o 31) desplaza la biosíntesis del anticuerpo que carece del dominio CH2 hacia la isoforma de la Forma B. El uso de péptidos conectores que incrementan la proporción de la Forma A producida conducirá a un avance beneficioso en el proceso, la producción y/o la estabilidad. Estos péptidos conectores de región bisagra sintética son útiles para favorecer la síntesis de la isoforma de la Forma A del anticuerpo que carece del dominio CH2 para cualquier isotipo de anticuerpo, p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en base al grado extremadamente alto de homología entre los dominios CH3 para los cuatro isotipos humanos. Incluidos los residuos de aminoácidos idénticos y conservados, el dominio CH3 de IgG1 es 98,13% homólogo a CH3 de IgG2, 97,20% homólogo a CH3 de IgG3 y 96,26% homólogo a CH3 de IgG4.

Ejemplo 4; Purificación de la Forma A y la Forma B a partir de una mezcla de anticuerpos monoclonales que contiene ambas isoformas

Se titularon 10 ml de sobrenadante ddCC49 con Tris 1M pH 9,0 hasta pH final de 7,5. Este material se filtró a través de una serie de membranas Sol-Vac 0,8 p. y 0,4 p. se pre-equilibró una columna de Proteína G de mL XK50 con 1xPBS a un índice de 80 ml/min. El sobrenadante titulado y filtrado se cargó en una columna a 80 ml/min. La proteína ligada se lavó con tampón de equilibrio por 2 volúmenes de columna y se eluyó con Glicina 100 mM a pH 3,0. Las fracciones que contenían el pico de ddCC49 se recogieron y titularon inmediatamente con Tris 1M pH 9,0 hasta un pH final de 7,0.

Se pre-equilibró una columna de fenilo Toso Biosep 5PW-HR con fosfato 20 mM pH 7,2; sulfato de amonio 1M. El eluato de Proteína G se tituló hasta sulfato de amonio 1 M usando un stock de sulfato de amonio 3,5 M pH 7,2, y se cargó a una concentración de 2 mg/ml de lecho de gel. La proteína ligada se lavó con fosfato 20mM pH 4 o 7.2 sulfato de amonio para ajustar la conductividad hasta 116,4 mS/cm. El material eluido a partir de esta condición tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 120 kD (Forma A) en SDS-PAGE no reductora. El resto del anticuerpo ligado se eluyó más con un gradiente lineal de contenido de sulfato de amonio reductor en el tampón de fosfato. Este último anticuerpo eluido aparentemente carece del enlace disulfuro entre las cadenas pesadas y su peso molecular es de aproximadamente 60 kDa (forma B).

Ambos materiales purificados anteriormente mencionados pueden recapturarse llevando la concentración de sulfato de amonio a 1M y recargándola en la columna de fenilo 5PW-HR limpia. La proteína ligada se eluye con fosfato 20mM pH 7,2 y se dializa en 1 xPBS.

Ejemplos. Comparación de estabilidad de la Forma A y de la Forma B

La actividad biológica de las Formas A y B (según lo medido en experimentos preliminares, p. ej., usando estudios de competición o unión directa) reveló que las Formas A y B tienen actividad biológica similar.

5 También se comparó la estabilidad de las Formas A y B. Se concentraron moléculas purificadas ddCC49 hasta aproximadamente 5 mg/ml mediante el concentrador Amicon equipado con una membrana YM30 (Millipore). Los materiales concentrados se dividieron en cuatro porciones equivalentes para cada una de las isoformas, y cada fracción se dispuso en un casete de diálisis de 10K (Pierce, cat. núm. 66410) durante 16 h en los siguientes tampones: 1) Fosfato de sodio 10 mM, pH 3; 2) Acetato de sodio 10 mM, pH 5; 3) Fosfato de sodio 10 mM, pH 7; y 4) Borato de sodio 10 mM, pH 9. Después de la diálisis, se ajustó la concentración de proteína de cada disolución hasta 3 mg/ml. Además de la disolución pura de las isoformas A y B, se mezcló una porción de las disoluciones A y B de cada pH para crear una mezcla que contenía 50% de cada isoforma. Se creó un total de 12 formulaciones (cuatro niveles de pH, 3 disoluciones de anticuerpo). Las disoluciones se filtraron y cargaron en viales de suero de vidrio de tipo 1 de 3 (West Pharmaceuticals) con tapón de butilo gris.

15 Se escogieron tres temperaturas, 2-8°C, 20-25°C y 38-42°C para almacenar las disoluciones de proteína para ensayo de la estabilidad. Antes del almacenamiento, se extrajeron 500 µl de muestras de cada formulación para análisis físico-químico, estos datos de punto de tiempo cero se denominan el control. Una vez almacenadas, las muestras se extrajeron según el siguiente cronograma: 2 semanas, 1 mes, 2 meses y 3 meses, y se enviaron para ensayo de inmediato.

20 Para evaluar la estabilidad físico-química de las dos isoformas, se utilizaron los siguientes métodos: turbidez medida a OD₃₂₀, SDS-PAGE no reductora y cromatografía de exclusión de tamaño.

La electroforesis SDS-PAGE no reductora se llevó a cabo en muestras almacenadas a 2-8°C, 20-25°C y 38-42°C durante diversos puntos de tiempo. Tanto la forma A como la forma B son relativamente estables a pH 5 cuando se almacenan a 2-8°C. Sin embargo, cuando se formularon a pH 7 y 9, ambas formas A y B exhibieron degradación como se indica con un número en aumento de bandas que fueron más pequeñas que las bandas principales originales (120 kDa para la forma A y 60 kDa para la forma B). Se observó que, particularmente para muestras de pH 7 y 9 almacenadas a temperaturas bajas e intermedias, la intensidad y el número de bandas que tenían menos de 55 kDa fueron superiores en la isoforma B que en la A. Esto indicó que bajo estas condiciones, la isoforma A es más estable que la isoforma B. No obstante, éste parece no ser el caso para la isoforma A a pH 5 y conservada a 20-25°C. Esta muestra pareció tener más fragmentos que la isoforma B. Esto parece haber sido un defecto de la imagen debido a la contaminación microbiana (se analiza en más detalle a continuación). A alta temperatura de conservación, ambas formas a pH 9 se degradaron significativamente y prácticamente no hubo diferencia en los patrones de gel entre las muestras. Bajo estas condiciones, se exhibieron cantidades mínimas de manchas en la parte superior del gel, lo que indicó la formación de agregados. Dado que los agregados podrían disolverse con SDS, la agregación se investigó usando los métodos descritos en las siguientes secciones.

35 La Tabla 5A a la Tabla 5C enumeran los datos de turbidez para ddCC49 conservado a diferentes temperaturas. La turbidez mide tanto los agregados solubles como los no solubles y se basa en la cantidad de luz dispersada por estas partículas. Cuando están presentes, los agregados dispersan luz y generan un incremento en A₃₂₀. Como se indica en la Tabla 5A-C, la turbidez de las moléculas ddCC49 conservadas a 2-8°C aumenta a medida que aumenta el pH para ambas isoformas A y B, donde la primera es menos turbia que la última. Esta tendencia es verdadera para muestras almacenadas durante menos de un mes a temperaturas superiores (20-25°C y 38-40°C). A medida que el tiempo de almacenamiento alcanzaba los 3 meses, la turbidez aumentaba significativamente para las muestras con alto pH y temperatura, y la diferencia entre las formas A y B se redujo. Estos resultados se equiparan con aquellos de SDS-PAGE e indican que ambas isoformas son relativamente estables (en términos de no formar agregados) a pH 3 y 5, y que la isoforma A es menos susceptible a agregación que la isoforma B.

45

ES 2 408 704 T3

Tabla 5A Turbidez medida a A_{320} para muestras de ddCC49 almacenadas a 2-8°C.

Tiempo (mes)	Isoforma A				Isoforma B				Mezcla			
	pH=3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
0	0,030	0,038	0,044	0,056	0,034	0,042	0,046	0,066	0,036	0,042	0,051	0,061
1/2	0,029	0,029	0,046	0,045	0,030	0,038	0,048	0,058	0,034	0,033	0,043	0,055
1	0,033	0,039	0,035	0,055	0,033	0,035	0,044	0,059	0,032	0,040	0,039	0,066
2	0,042	0,022	0,042	0,044	0,039	0,037	0,055	0,067	0,042	0,024	0,040	0,058
3	0,035	0,047	0,051	0,050	0,038	0,041	0,066	0,081	0,027	0,048	0,051	0,065

Tabla 5B. Turbidez medida a A_{320} para muestras de ddCC49 almacenadas a 20-25°C

Tiempo (mes)	Isoforma A				Isoforma B				Mezcla			
	pH=3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
1/2	0,031	0,032	0,056	0,066	0,039	0,034	0,064	0,083	0,034	0,039	0,060	0,071
1	0,025	0,043	0,055	0,090	0,034	0,042	0,070	0,084	0,028	0,039	0,055	0,094
2	0,034	0,053	0,077	0,113	0,046	0,032	0,090	0,087	0,037	0,038	0,066	0,108
3	0,036	0,056	0,156	0,143	0,029	0,060	0,121	0,125	0,044	0,050	0,101	0,142

5 Tabla 5C. Turbidez medida a A_{320} para muestras de ddCC49 almacenadas a 38-42°C

Tiempo (mes)	Isoforma A				Isoforma B				Mezcla			
	pH=3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
1/2	0,041	0,042	0,068	0,063	0,041	0,044	0,080	0,067	0,041	0,039	0,070	0,064
1	0,041	0,043	0,071	0,065	0,036	0,040	0,079	0,069	0,032	0,048	0,078	0,070
2	0,047	0,030	0,066	0,060	0,046	0,045	0,087	0,082	0,051	0,034	0,078	0,079
3	0,058	0,051	0,098	0,105	0,046	0,057	0,101	0,157	0,056	0,057	0,101	0,126

10

La cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) es un método poderoso para revelar el porcentaje de moléculas intactas y los productos degradados (tanto fragmentos como agregados solubles) y es altamente reproducible. En la Tabla 5A-C, se enumera el porcentaje de monómero intacto de la isoforma A, la isoforma B y la mezcla almacenada a distintas temperatura. Para muestras almacenadas a 2-8°C, está claro que la Forma A tiene un porcentaje mayor de monómero en comparación con la Forma B, y la mezcla de la Forma A y la Forma B fue algo intermedio. A esta temperatura de almacenamiento, ambas formas fueron relativamente estables a pH 3,5 y 7 (donde el pH 5 es la

condición más estable) durante aproximadamente tres meses. No obstante, a pH 9 hubo una reducción importante en el porcentaje de monómero para la Forma B, pero solamente una reducción ligera para la Forma A. A temperaturas elevadas, todas las muestras exhibieron una reducción importante en el porcentaje de monómero a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento; la isoforma A exhibió un desempeño superior que la isoforma B. Sin embargo, hubo una excepción, la muestra de la isoforma A a pH 5 almacenada a temperatura ambiente exhibió mucho más degradación que la isoforma B o la mezcla bajo condiciones de almacenamiento similares. En un examen minucioso de este vial de la isoforma A particular, los datos de SDS-PAGE y SEC de la muestra indicaron que la contaminación microbiana podría haber causado este resultado inesperado. Primero, tanto los resultados de SEC como de SDS-PAGE indicaron que la degradación para esta muestra se atribuyó principalmente a un incremento en la fragmentación, que supuestamente resulta de la digestión microbiana, de lo contrario, se esperaría cierto grado de incremento en la agregación. En segundo lugar, el hecho de que la muestra de la mezcla, que contenía 50% de cada isoforma A y B, demostrara un mejor perfil de solubilidad que la isoforma B, indicando una isoforma A más estable, debe haber contribuido al mayor porcentaje de monómero. Finalmente, la isoforma A a pH 5, almacenada a 2-8°C y 38-42°C, demostró un porcentaje mayor de monómero que la isoforma B bajo condiciones similares. Por consiguiente, la temperatura de almacenamiento intermedia debería haber producido resultados similares. Debido a la cantidad limitada de muestras, no se pudo llevar a cabo un ensayo de contaminación microbiana.

Se observó también que para ambas isoformas de IDEC-159 conservada a alto pH (9) y a 40°C, el porcentaje de monómero se redujo a aproximadamente 30%. Bajo estas condiciones rigurosas, las diferencias de estabilidad entre las dos isoformas desaparecieron. Este resultado de SBC refleja los resultados hallados usando SDS-PAGE. Ambos resultados indican que, aunque algunas características físico-químicas difieren entre las dos isoformas, el mecanismo y los productos secundarios de degradación para ambas isoformas son similares, si no idénticos.

En síntesis, los resultados de SEC indican que ambas isoformas A y B tienen pH óptimo a aproximadamente 5, y que la isoforma A es más estable que la isoforma B en términos de retención de un porcentaje superior de monómero intacto en condiciones de almacenamiento similares.

Tabla 6A Porcentaje de monómero para muestras de ddCC49 almacenadas a 2-8°C.

Tiempo (mes)	Isoforma A				Isoforma B				Mezcla			
	pH= 3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
0	98,81	99,13	98,16	97,93	97,02	97,70	96,88	93,51	97,83	98,27	97,44	95,81
½	98,98	99,16	98,25	98,00	97,15	97,87	96,96	91,95	98,15	98,49	97,68	95,59
1	98,80	99,20	97,99	97,11	97,02	97,81	96,62	88,99	98,04	98,45	97,41	94,45
2	98,74	99,01	98,00	95,67	97,15	97,69	95,50	84,84	98,06	98,34	96,81	92,17
3	98,28	98,89	97,88	95,31	96,69	98,14	95,37	85,98	97,61	98,15	96,65	89,90

Tabla 6B. Porcentaje de monómero para muestras de ddCC49 almacenadas a 20-25°C

Tiempo (mes)	Isoforma A				Isoforma B				Mezcla			
	pH= 3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
1/2	97,83	99,04	97,12	93,65	95,84	97,62	93,71	79,61	96,75	98,30	95,37	87,67
1	96,60	96,63	95,65	88,09	94,38	97,23	90,69	72,26	95,36	97,99	93,05	80,92
2	93,62	92,79	93,17	80,06	91,71	96,96	85,51	66,53	92,78	97,51	89,33	73,91

ES 2 408 704 T3

	Isoforma A				Isoforma B				Mezcla			
Tiempo (mes)	pH= 3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
3	92,81	89,56	X	74,31	89,30	96,04	82,57	63,25	90,46	97,02	86,80	69,36

Tabla 6C. Porcentaje de monómero para muestras de ddCC49 almacenadas a 38-42°C

	Isoforma A				Isoforma B				Mezcla			
Tiempo (mes)	pH= 3	5	7	9	3	5	7	9	3	5	7	9
1/2	86,31	97,50	85,06	66,42	79,85	94,29	69,68	63,64	82,09	95,70	76,24	63,95
1	78,71	95,19	73,77	51,55	66,73	89,37	54,70	50,10	68,53	92,02	62,93	49,28
2	66,64	91,63	60,45	38,43	60,29	81,08	42,98	37,09	61,33	85,81	51,08	36,68
3	57,87	86,99	52,82	30,81	43,61	74,23	36,68	29,73	46,75	80,93	44,35	30,18

Ejemplo 6. Purificación preparativa de las Formas A y B

- 5 IDEC-159 (ddCC49) es un anticuerpo monoclonal que carece del dominio CH2 dirigido contra el antígeno TAG-72, que se expresa en la superficie de tumores. IDEC-159 contiene dos isoformas del anticuerpo, llamadas Forma A y Forma B. El proceso de cultivo celular actual para IDEC-159 produce una relación aproximada 50:50 de la Forma A a la Forma B. La isoforma de la Forma A es un anticuerpo con una región que carece de CH2 en la porción F_C de la cadena pesada. Además de tener una región que carece de CH2, la Forma B también carece del enlace disulfuro en la región F_C y se mantiene unida solamente por interacciones hidrófobas y puentes de sal.

10 La tercera y última etapa de cromatografía en el proceso de purificación de IDEC-159 fue desarrollada para separar las dos isoformas de IDEC-159. La separación se logra por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), usando un adsorbente de fenilo TSKgel 5PW-HR. Ya que la Forma B es más hidrófoba que la Forma A, se adsorbe irreversiblemente a la fase estacionaria usando aproximadamente sulfato de amonio 0,73 M/fosfato de sodio 20 mM, pH 4,0 - pH 7,0 como la fase móvil. La Forma A se une en un grado menor a la fase estacionaria bajo estas condiciones y por lo tanto se eluye isocráticamente, es decir, deja la columna con la fracción de Flowthrough. Después de la elución isocrática de la Forma A, la omisión de sulfato de amonio de la fase móvil desorbe la Forma B. El siguiente método se empleó para separar las dos isoformas de IDEC-159:

- La columna se desinfectó usando ≥ 3 CV de NaOH 0,5 N, a ≤ 150 cm/h.
- 20 -La columna se equilibró usando ≥ 5 CV de sulfato de amonio 0,73 M/fosfato de sodio 20 mM, pH 4,0, a ≤ 150 cm/h.
- La columna se cargó con TMAE Flowthrough a temperatura ambiente que había sido ajustado para incluir 0,43 volúmenes de sulfato de amonio 2,5 M/fosfato de sodio 20 mM, pH 4,0 disolución stock de líquido, a 5 mg por ml de resina. El anticuerpo se cargó en la columna a pH 4,0, a < 100 cm/h. La recolección del anticuerpo comenzó cuando el valor O.D. de salida a 280 nm alcanzó 10 mAU.
- 25 -La columna se lavó usando 15 CV de sulfato de amonio 0,73 M/fosfato de sodio 20 mM, pH 4,0, a ≤ 100 cm/h. Se continuó con la recolección del anticuerpo durante el lavado de 15 CV, luego la salida se desvió a desecho.
- La columna se destiló usando ≥ 5 CV de fosfato de sodio 20 mM, pH 4,0, a ≤ 100 cm/h. 6. La columna se lavó con ≥ 3 CV de NaOH 0,5 N a ≤ 150 cm/h.
- La columna se equilibró con ≥ 3 CV de sulfato de amonio 0,73 M/fosfato de sodio 20 mM, pH 4,0, a ≤ 150 cm/h.

-La columna se conservó en ≥ 3 CV de etanol al 20% a ≥ 150 cm/h.

5 -La separación de las dos formas en una escala preparativa (volumen de la columna de 5L, carga IDEC-159 total de aproximadamente 20 g) se ha efectuado. Los primeros dos picos comprenden la elución isocrática de la Forma A, el segundo pico exhibe la Forma B eluída, mientras que el tercer pico contiene impurezas, que son eliminadas de la fase estacionaria durante la limpieza.

-La capacidad de este método para separar las Formas A y B a una escala preparativa se demostró también por SDS PAGE. Las fracciones eluídas isocráticamente usando sulfato de amonio 0,73 M/fosfato de sodio 20 mM, pH 4,0 (hileras 6 a 8) contienen predominantemente la Forma A (pureza > 90 %).

Ejemplo 7. Humanización del anticuerpo monoclonal CC49

10 Se efectuaron varios cambios al anticuerpo CC49 para crear una versión 2 de CC49 humanizado (huCC49 V2). Para reducir más la inmunogenicidad potencial de CC49 MAb humanizado, los residuos murinos presentes en el anticuerpo se examinaron y consideraron para reemplazo con los residuos de marco humanos derivados de secuencias aceptoras humanas LEN para sustituciones de cadena ligera y 21/28' CL para sustituciones de cadena pesada. (Singer II et al., 1993. Optimal Humanization of 1B4, an Anti-CD18 Murine Monoclonal Antibody, is Achieved by Correct Choice of Human V-Region Framework Sequences. J. Immunol. 150:2844-2857. Padlan E A, 1991. Possible Procedure For Reducing the Immunogenicity of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties. Molecular Immunol. 28:489-498).

20 Los residuos de marco considerados importantes para conservar la especificidad y afinidad del sitio de combinación revelaron solamente unas pocas diferencias. En la secuencia de cadena pesada, los residuos enterrados pronosticados en las posiciones 69 (leucina) y 93 (treonina) se sustituyeron ambos con los residuos humanos isoleucina y alanina, respectivamente. En la secuencia de cadena ligera, un residuo que se pronosticó estar principalmente enterrado en la posición 43 (serina) se sustituyó con el residuo humano prolina.

25 Se prepararon formas que carecen del dominio en el anticuerpo V2 CC49 y se insertaron péptidos conectores en la secuencia huCC49 V2. Se preparó huCC49 V2 que carece del dominio CH2 y que contiene el péptido conector bisagra G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] tal como estaba el huCC49 V2 que carece del dominio CH2.

Ejemplo 8. Perfiles de biodistribución mejorados de los anticuerpos que comprenden los nuevos péptidos conectores.

30 Se ensayaron diversas formas de anticuerpos que carecen de dominio (con y sin péptidos conectores) en un ensayo de unión competitivo para su capacidad de unirse a mucina submaxilar bovina, una fuente del antígeno TAG-72, por inmunoensayo fluorométrico de resolución en tiempo, usando un contador Wallac 1420 Multilabel Victor V (PerkinElmer). Se evaluaron HuCC49 PAP (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 32), HuCC49 V2 PAP (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 32), HuCC49 G1/ G3:PAP (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5), HuCC49 V2 G1/G3/PAP (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5), y anticuerpos HuCC49 originales control. Las actividades de unión 35 relativas para los tres anticuerpos genéticamente modificados con bisagra no pueden distinguirse o están dentro de 2-3 veces el anticuerpo CC49 control original.

40 La biodistribución de HuCC49 V2 PAP (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 32) conjugado al ligando de ácido ⁹⁰Y-2-(p-isotiocianatobencil) (p-SCN-Bz)-ciclohexildietileno-triaminapentaacético (CHx-DTPA) y el anticuerpo HuCC49 control se evaluaron y compararon en ratones atómicos que portaban xenoinjertos de tumor humano LS-174T. El porcentaje de dosis inyectada (%ID) del anticuerpo radiomarcado con ⁹⁰Y por gramo de tumor o tejido normal se determinó a 3 y 24 horas y se indica en la Tabla 7.

Tabla 7.

7 ratones/grupo					
	Sangre	Bazo	Riñón	Hígado	Tumor
HuCC49					
3 h	20,1 ± 3,5	6,1 ± 1,6	11,7 ± 1,7	10,1 ± 1,8	9,3 ± 2,0
24 h	0,7 ± 0,2	9,5 ± 4,0	11,0 ± 2,0	12,0 ± 1,5	12,7 ± 7,1
HuCC49 V2 PAP					

7 ratones/grupo					
	Sangre	Bazo	Riñón	Hígado	Tumor
3 h	24,6 ± 3,0	4,6 ± 2,2	10,0 ± 1,4	8,4 ± 1,0	16,1 ± 5,0
24 h	2,0 ± 0,6	7,7 ± 1,8	6,7 ± 0,4**	11,2 ± 2,2	21,3 ± 4,8*

Los datos representan desviaciones estándar de la media.

* $p < 0,05$ prueba de la t para datos independientes en comparación con HuCC49 en un punto de tiempo de 24 h en tumor

5 ** $p < 0,001$ prueba de la t para datos independientes en comparación con HuCC49 en un punto de tiempo de 24 h en riñón

Sorprendentemente, en el punto de tiempo de 24 horas, la absorción de HuCC49 V2 PAP fue significativamente mayor en el tumor ($p < 0,05$ prueba de la t para datos independientes) y, a la inversa, menor en el riñón ($p < 0,01$) que en el anticuerpo HuCC49 control. Cuando se comparó la relación del tumor al órgano para estos anticuerpos, el HuCC49 V2 PAP resultó en una relación superior del tumor al órgano para todos los órganos, excepto sangre.

10 Estos resultados sugieren que estas nuevas bisagras imparten cambios estructurales a los anticuerpos que afectan positivamente la localización del tumor y disminuyen la absorción por parte de órganos normales, como el riñón. Por ende, estas nuevas bisagras son particularmente útiles cuando se incorporan a anticuerpos terapéuticos.

Ejemplo 9. Perfiles de biodistribución mejorados de anticuerpos que comprenden los nuevos péptidos conectores: Curso de tiempo detallado

15 Este ejemplo confirma y extiende los resultados presentados en el Ejemplo 8. Los anticuerpos CC49 V2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 5) y HuCC49 (gly/ser) humanos se diafiltraron y concentraron en tampón de acetato de sodio 5mM con bajo contenido de metal, pH 5 (LMB) utilizando Amicon Centricon 30 previamente enjuagado. La centrifugación del Centricon se llevó a cabo en un rotor de ángulo fijo a 5000x g mantenido a una temperatura de 2-8°C. Cada anticuerpo se recuperó añadiendo 50 µl de LMB al depósito de la muestra, agitando brevemente en vórtex, y retrocentrifugando durante 10 minutos a 1000x g. La concentración de proteína se determinó usando análisis de espectrometría UV a 280nm, utilizando un coeficiente de extinción de 1,48. Cada anticuerpo se ajustó luego a 10,5 mg/ml usando LMB.

20 Los anticuerpos se ajustaron hasta ~pH 8,6 utilizando ácido bórico 1,0 M (pH 8,6, se trataron con Chelex y se pasaron por un filtro de 0,2 µm). CHx-DTPA (disuelto en ácido bórico 1,0 M) se añadió luego en una relación molar de 3 quelatos hasta 1 mol de anticuerpo. La cantidad de ácido bórico añadido fue de un décimo el volumen del anticuerpo. Esta mezcla se agitó luego en vórtex y se incubó durante 16 a 18 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo la mezcla a un nuevo Centricon 30 pre-enjuagado y se diafiltró en acetato de sodio 5mM con bajo contenido de metal, cloruro de sodio 150mM, pH 5 conforme a la diafiltración previa. La concentración de cada anticuerpo se ajustó hasta 3mg/ml.

30 Se inocularon ratones atímicos s.c. con células LS174T suspendidas en HBSS (Biowhittaker, Cat. núm. 10-547F) en la parte interna del muslo derecho. Se midieron los tamaños de los tumores un día antes de comenzar. Los volúmenes de los tumores se calcularon multiplicando la longitud por la mitad del ancho al cuadrado [$Lx ((W^2)/2)$]. Los ratones fueron agrupados para dar un volumen de tumor promedio de ~200mm³.

35 Cuarenta y dos ratones atímicos recibieron una inyección del anticuerpo que carece del dominio cH2 marcado con ¹¹¹In en el tiempo cero. El estudio rastreó la distribución del anticuerpo durante el curso de siete puntos de tiempo, donde cada punto de tiempo consistió en seis ratones. Se recogió la orina de cada ratón, sosteniendo al ratón sobre papel tarado y oprimiendo la vejiga. Se extrajo sangre por "extracción de sangre ocular" (aproximadamente 200ul por ratón). Para cada ratón individual, se recogieron las heces excretadas durante la muestra de sangre y orina. Después de la extracción de sangre, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Una vez que cada uno de los seis ratones había sido sacrificado, se recogieron las otras muestras por disección. Cada muestra (excepto la de piel) se enjuagó con formalina al 3%, se secó sobre una toalla de papel y luego se pesó. Todas las muestras se pesaron utilizando papel tarado.

45 Después de obtener las muestras, éstas se dispusieron en tubos de ensayo de borosilicato y se contaron en un contador gamma junto con un control de degradación que consistió en una dilución 1:10 del anticuerpo marcado. Se calculó el porcentaje de radiactividad asociado con cada órgano o tejido en relación con el control de degradación (% dosis inyectada/g tejido u órgano). El ejemplo muestra que las moléculas de anticuerpo que comprenden este nuevo péptido conector exhiben una menor acumulación en el riñón, una acumulación ligeramente mayor en la

sangre y una acumulación significativamente mayor en el tumor. Este perfil coincide con estas moléculas que tienen mayor estabilidad *in vivo* y mejor eficacia y seguridad.

Ejemplo 10. Los anticuerpos que comprenden péptidos conectores tienen menor sensibilidad a los agentes reductores

- 5 El ejemplo demuestra que CC49 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] que carece del dominio (SEQ ID NO: 5) parece más estable hacia la reducción de glutatión (GSH), como lo es el CC49 original, que CC49 que carece del dominio con un enlazador bisagra Gly-Ser.

10 En síntesis, se incubaron 50 ug de ddCC49 (Gly-Ser), ddCC49 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 5) o CC49 original con GSH 0, 1, 5 o 10 mM durante una hora a temperatura ambiente. Los tampones de reacción incluyen PBS 100 mM, pH 7,2 o acetato de sodio 100 mM, NaCl 100 mM, pH 4,5. Los anticuerpos tratados con GSH se calentaron con SDS y se aplicaron a un gradiente de 4-20% de gel no reductor SDS-PAGE. Las muestras aplicadas se dejaron migrar a través del gel a 120 Voltios constantes durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas se tiñeron con Coomassie y los geles se secaron.

15 CC49 que carece del dominio G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) parece más estable hacia la reducción con glutatión (GSH), como lo es CC49 original, que CC49 que carece del dominio con un enlazador bisagra Gly-Ser. A su vez, acetato de sodio 100 mM a pH 4,5 protege más a CC49 que carece del dominio G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 5) de la reducción de GSH en comparación con PBS 100 mM a pH 7,2. Esta observación inesperada de la menor sensibilidad a los agentes reductores sugiere que el diseño de la bisagra G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 5) posibilita el uso de químicas que emplean agentes reductores, tales como aquellas utilizadas para preparar conjugados de fármacos (p. ej., enlazadores SPDP) o técnicas para unir radioisótopos a anticuerpos (p. ej., ^{99m}Tc), a la vez que se mantiene la integridad física del anticuerpo. Esta ventaja con respecto a la sensibilidad al agente reductor no parece alterar las ventajas de farmacocinética de constructos que carecen del dominio CH2 (véanse los datos de biodistribución de ratones en el Ejemplo 9). La reducción en la sensibilidad a los agentes reductores también puede ser predictiva de una mayor estabilidad *in vivo*.

Ejemplo 11. Anticuerpo anti-CD20 que comprende un péptido conector

30 El péptido conector de la región bisagra G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 5) se introdujo en un anticuerpo C2B8 que carece del dominio CH2 como se describió en el Ejemplo 3. C2B8 es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico que consiste en dominios variables de las cadenas pesada y ligera de murino condensadas a dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas, respectivamente. Las modificaciones correctas a la región bisagra se confirmaron por análisis de secuencias de DNA. Se usó DNA plasmídico para transformar células CHO DG44 para producción transitoria de proteína de anticuerpo.

35 Se recogió el sobrenadante de las células produciendo anticuerpo C2B8 que carece del dominio CH2 que contenía el péptido conector G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser], y se determinó la concentración de anticuerpo en los sobrenadantes de cultivo por inmunoensayo. Aproximadamente 3ng de proteína de anticuerpo total del cultivo de células transitorias se comparó con huCC49 MAb que carecía del dominio CH2 por electroforesis SDS-PAGE no reductora seguida de inmunotransferencia con anticuerpo conjugado IgG HRP antihumano para detectar las isoformas de la Forma A y la Forma B de huCC49 que carece del dominio CH2. Bajo estas condiciones, la Forma A migra como un homodímero sencillo de 120 kDa y la Forma B como un doblete de 60 kDa. Se halló que la incorporación del péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5 aumenta sustancialmente la proporción de la Forma A producida. Los resultados demuestran que G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + bisagra [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) resultó en la producción de esencialmente todo el anticuerpo C2B8 que carece del dominio CH2 de la Forma A, con poca o ninguna Forma B detectable, demostrando que la utilidad de esta bisagra de producir la isoforma de la Forma A es en general aplicable a anticuerpos de especificidades variables.

45 Ejemplo 12. Anticuerpo anti-CD23 que comprende un péptido conector

50 El péptido conector de región bisagra G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 5) se utilizó para construir un anticuerpo 5E8 que carece del dominio CH2 (5E8ΔCH2) esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 3. 5E8 es un anticuerpo monoclonal anti-CD23 quimérico que consiste en dominios variables de las cadenas pesada y ligera de primate condensados a dominios constantes de las cadenas pesada y ligera de seres humanos, respectivamente. Las modificaciones correctas a la región bisagra se confirmaron por análisis de secuencias de DNA. Se conocen en la técnica las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada de 5E8. Se utilizó DNA plasmídico para transformar células CHO DG44 para reducción de proteína de anticuerpo.

55 Una línea celular (1A7) que contenía el péptido conector G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) introducido en la secuencia del anticuerpo 5E8ΔCH2 se usó para producción del anticuerpo. El anticuerpo se produjo

y purificó utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 4 anteriormente expuesto. El anticuerpo 5E8 Δ CH2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245, purificado empleando solamente la columna de Proteína G se eluyó esencialmente como un pico individual con $\geq 97\%$ pureza sin más purificación de HIC. Las muestras de proteína purificada reducidas y no reducidas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Bajo condiciones no reductoras, se espera que la Forma A migre como un homodímero sencillo de 120 kDa y la Forma B como un doblete de 60 kDa. Se halló que el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5 aumenta sustancialmente la proporción de la Forma A producida. Este resultado indica que la bisagra G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) resultó en la producción de prácticamente todo el anticuerpo 5E8 Δ CH2 de la Forma A con poca o ninguna Forma B detectable (véase hilera 2), demostrando que la utilidad de esta bisagra para producir la isoforma de la Forma A es en general aplicable a anticuerpos de especificidades variables. Se examinó el anticuerpo 5E8 Δ CH2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 por cromatografía de exclusión de tamaño y se descubrió que se eluye como pico individual, indicando que no hubo agregación o descomposición importante del producto de anticuerpo 5E8 Δ CH2. El anticuerpo G1/G3/Pro243Ala244Pro245 se ensayó en más detalle en un ensayo de unión competitiva FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) para unión de CD23 soluble marcado con Cy5 a 5E8 IgG marcado con EU, usando un fluorímetro Delphia (Wallac 1420 Multilabel Counter Victor V, PerkinElmer). 5E8 Δ CH2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 (que contenía el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5), y los anticuerpos control originales 5E8 IgG se evaluaron en ensayos de unión competitiva. La actividad de unión relativa del anticuerpo modificado con bisagra no fue distinguible del anticuerpo control original 5E8 IgG. A partir de estos resultados, es claro que la introducción de la región bisagra (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5) en el anticuerpo 5E8 Δ CH2 condujo a la síntesis preferencial de la isoforma A, a la vez que se retuvo totalmente la actividad de unión. Esto respalda la utilidad general de las bisagras genéticamente modificadas.

Ejemplo 13. Anticuerpo chB3F6 que comprende un péptido conector

El péptido conector de región bisagra G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO: 5) se usó para construir un anticuerpo B3F6 quimérico que carece del dominio CH2 (chB3F6 Δ CH2) esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 3. "chB3F6" es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CRIPTO que consiste en dominios variables de las cadenas pesada y ligera de murino condensados a dominios constantes de las cadenas pesada y ligera de seres humanos, respectivamente. Las modificaciones correctas a la región bisagra se confirmaron por análisis de secuencias de DNA. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera de chB3F6 se indican en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Se utilizó DNA plasmídico para transformar células CHO DG44 para producción de proteína de anticuerpo.

Una línea celular (3C7) que contenía el péptido conector G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) introducido en la secuencia del anticuerpo chB3F6 Δ CH2 se utilizó para producción del anticuerpo. El anticuerpo se produjo y purificó empleando los métodos descritos en el Ejemplo 4 anteriormente expuesto. El anticuerpo ChB3F6 Δ CH2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245, purificado usando solamente la columna de Proteína G, se eluyó esencialmente como un pico individual con 97% pureza sin más purificación de HIC. Las muestras de proteína purificada reducidas y no reducidas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Bajo estas condiciones, se espera que la Forma A migre como un homodímero sencillo de 120 kDa y la Forma B como un doblete de 60 kDa. Se halló que el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5 incrementa sustancialmente la proporción de la Forma A producida. Estos resultados demuestran que la bisagra G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser] (SEQ ID NO:5) resultó en la producción de prácticamente todo el anticuerpo chB3F6 Δ CH2 de la Forma A con poca o ninguna Forma B detectable, demostrando que la utilidad de esta bisagra para producir la isoforma de la Forma A es en general aplicable a anticuerpos de especificidades variables. El anticuerpo ChB3F6 Δ CH2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 se examinó por cromatografía de exclusión de tamaño y se halló que se eluye esencialmente como un pico individual en el intervalo de 93-98% monómero, indicativo de poca o ninguna agregación o descomposición significativa del producto de anticuerpo. El anticuerpo ChB3F6 Δ CH2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 se ensayó en más detalle en un ensayo de unión competitiva de citometría de flujo con B3F6 IgG marcado con FITC unido a células de tumores GEO, una fuente del antígeno de CRIPTO. Se evaluaron la unión competitiva de ChB3F6 Δ CH2 G1/G3/Pro243Ala244Pro245 (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5), y dos muestras control de anticuerpos chB3F6 IgG. La actividad de unión relativa del anticuerpo genéticamente modificado con bisagra no fue distinguible de los anticuerpos control originales chB3F6 IgG. A partir de estos resultados, es claro que la introducción de la región bisagra (que contiene el péptido conector que se indica en la SEQ ID NO: 5) en el anticuerpo chB3F6 Δ CH2 condujo a la síntesis preferencial de la isoforma A, a la vez que se retuvo la actividad de unión total. Esto respalda además la utilidad general de las bisagras genéticamente modificadas.

Ejemplo 14. Preparación de formas humanizadas de anticuerpo B3F6 anti-Cripto

Se secuenciaron las regiones variables del anticuerpo B3F6. La secuencia de las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo B3F6 murino se expone a continuación:

1 **Df** LMTQTPLS LPVSLGDOAS ISCRsSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 51 **LLiY** KvsnRF SGVPDRFSgS GSgTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFqGSHVp
 101 **LIFGAGTKLE** **LK** (SEQ ID NO:39)

La secuencia de las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo B3F6 murino se expone a continuación:

1 **QVQLQQVGAELVKPGASVKLSCKAsgyTfT** SYWiHWVKQR PGQGLEWIGE
 51 **NDpSNgRTINy** NEKfKNKATL TvDKSSSTAY MHLSSLTSED SAVYYCSrGP
 101 **NYFYsMDyWG** **QGTsvTVSS** (SEQ ID NO:40)

5 Para cada una de estas secuencias, los residuos CDR se indican subrayados, los residuos canónicos se indican en letra minúscula y los residuos canónicos inusuales se indican en letra minúscula, cursiva y negrita.

10 Las regiones determinantes de complementaridad (CDR) se clasificaron en clases canónicas. Las CDR contienen los residuos que más probablemente se unen al antígeno y deben retenerse en el anticuerpo reconformado. Las CDR se definen por secuencia según Kabat et al (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. y Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Merest 5^a Edición, U.S. Dept. Health and Human Services. U.S. Govt. Printing Office). Las CDR se categorizaron como clases canónicas (Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R., Colman, P.M., Spinelli, S., Alzari, P.M. y Poljak, R.J. (1989) Nature 342:877-883), en donde los residuos clave determinan en un alto grado la conformación estructural del bucle de la CDR. Estos residuos prácticamente siempre se retienen en el anticuerpo reconformado. Las CDR de cadenas pesada y ligera se clasificaron en clases canónicas del siguiente modo:

15	Cadena ligera:		Cadena pesada:	
	L1: 16 residuos	Clase 4	H1: 5 residuos	Clase 1
	L2: 7 residuos	Clase 1	H2: 17 residuos	Clase 2
	L3: 9 residuos	Clase 1	H3: 10 residuos	Ninguna clase canónica

20 Los residuos canónicos importantes para estas clases se indican en la Tabla 8. El bucle L1 posee una F en la posición 2, mientras que los residuos canónicos son V/I. El bucle H2 posee una V en la posición 71, mientras que los residuos canónicos son A/T/L (aunque V es canónico para la clase 1 de H2).

TABLAS 8

25	L1	Clase 4	2(V,I) 25(S) 27b(I,L) 33(L) 71(F)
	L2	Clase 1	48(I) 51(A,T) 52(S,T) 64(G)
	L3	Clase 1	90(Q,N,H) 95(P)
	H1	Clase 1	24(A,V,G), 26(G), 27(F,Y), 29(F), 34(M,W,I), 94(R,K)
	H2	Clase 2	52a(P,T,A) 55(G,S) 71(A,T,L)
	H3	Ninguna clase canónica	

30 Las cadenas ligera y pesada variables se compararon con las secuencias de consenso para subgrupos de ratón y humanos (Kabat et al. 1991) empleando el programa FASTA y una base de datos de secuencias de consenso. Se halló que la cadena ligera variable era miembro del subgrupo de ratón Kappa 2 con una identidad de 92,9% en una superposición 113 aa. A continuación se muestra una alineación:

Alineación de la cadena ligera de B3F6 contra el subgrupo de ratón Kappa 2

»Longitud moukv2: 113 agosto 6, 1992 15:04 Tipo: P C (113 aa)

35 initn: 654 init1: 654 opt: 700 puntaje z: 83,4 E(): 0,24

Puntaje Smith-Waterman: 700; 92,920% identidad en superposición 113 aa

ES 2 408 704 T3

```

          10          20          30          40          50          60
B3F6 L DFLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRF
      X .....
moukv2 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRF
          10          20          30          40          50          60

          70          80          90          100         110
B3F6 L SGVPDRFSGSGS GTFDLTKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-LTFGAGTKLELK(SEQ ID NO:39)
      .....X .....
moukv2 SGVPDRFSGSGS GTFDLTKISRVEAEDLGVYYCFQGTHVPPYTFGGGTTKLEIK(SEQ ID NO:41)
          70          80          90          100         110

```

Se halló que la cadena pesada variable era miembro del subgrupo de ratón 2B con una identidad de 80,5% en la superposición 128 aa. A continuación se muestra una alineación:

Alineación de cadena pesada de B3F6 contra el consenso del subgrupo 2B de ratón

5 »Longitud mouhv2b: 127 agosto 6, 1992 15:04 Tipo: P (127 aa)

initn: 664 init1: 592 opt: 653 puntaje z: 96,8 E(): 0,043

Puntaje Smith-Waterman: 653; 80,469% identidad en la superposición 128 aa

```

          10          20          30          40          50          60
B3F6 H QVQLQQVGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKQRPGQGLEWIGENDPSNGRTNY
      X.....
mouhv2 QVQLQQVGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDPNSGGTNY
          10          20          30          40          50          60

          70          80          90          100         110
B3F6 H NEKFKNKATLTFVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSR----GPN-----YFYSDYWGQ
      .....X : . :. :.
mouhv2 NEKFKSKATLTFVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYYGSSXXVYXYWY-FDYWGQ
          70          80          90          100         110

B3F6 H GTSVTVSS (SEQ ID NO:40)
      .....
mouhv2 GTTIVTVSS (SEQ ID NO:42)
      120

```

10 La cadena ligera variable corresponde al subgrupo humano Kappa 2 con 76,3% de identidad en la superposición 114 aa. A continuación se muestra una alineación:

Alineación del consenso de Kappa 2 del subgrupo humano de cadena ligera de B3F6

»Longitud humkv2: 114 agosto 6, 1992 15:04 Tipo: P C (114 aa)

initn: 566 init1: 383 opt: 571 puntaje z: 73,2 E(): 0,88

Puntaje Smith-Waterman: 571; 76,316% identidad en la superposición 114 aa


```

                10      20      30      40      50
B3F6 L DFLMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSIVHS-NGNTYLEWYLOKPGQSPKLLIYKVSNR
      :.....: .: .....: .X:.....: .....: :
humkv2 DIVMTQSELSLEVTPEPASISCRSSQSILHLSXDGNNYLNWYLOKPGQSPOLLIYLVSNR
                10      20      30      40      50      60

                60      70      80      90      100     110
B3F6 L FSGVPDRFSGSGSSTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-LTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO:39)
      :.....: .X :...: .....:
humkv2 ASGVPEDRFSGSGSSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQXPRXTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:43)
                70      80      90      100     110

```

La cadena pesada corresponde al subgrupo humano 1 con una identidad de 65,1% en superposición 129 aa. A continuación se muestra una alineación:

Alineación de cadena pesada de B3F6 contra el consenso del subgrupo 1 humano

5 »Longitud humhv1: 129 agosto 6, 1992 15:04 Tipo: P C (129 aa)

initn: 348 inlt1: 274 opt: 532 puntaje z: 85.5 E(): 0.18

Puntaje Smith-Waterman: 532; 65,116% identidad en superposición 129 aa

```

                10      20      30      40      50
B3F6 H QVQLQQVGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWKQRPQGQLEWIGENDP-SNGRTN
      X::: : :...: .....: .....: : :...: .....: .X :...: :
humhv1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYAISWVRQAPGQLEWIMGWINPYGNGDTN
                10      20      30      40      50      60

                60      70      80      90      100     110
B3F6 H YNEKFKNKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSRGPNYF-----YSMDYWG
      : .....: : .....: : .....: : .....: : .....: : .....:
humhv1 YAQKFOGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAPGYGSGGGCYRGDYXFDYWG
                70      80      90      100     110     120

B3F6 H QGTSVTVSS (SEQ ID NO:40)
      :...: .....:
humhv1 QGTLVTVSS (SEQ ID NO:44)

```

10 En un diseño de humanización, se utilizó la estructura de rayos x del B3F6 Fab que forma complejo con el péptido de unión del antígeno. Las secuencias de anticuerpos expresadas humanas más similares se seleccionaron para uso como los marcos de anticuerpo. Para encontrar las secuencias expresadas más próximas, los marcos humanos expresados más homólogos se buscaron en la base de datos NCBI NR y en la base de datos Kabat. Para secuencias de cadenas pesada y ligera, se realizaron dos búsquedas (con CDR enmascarada y no enmascarada).

15 La selección de la secuencia expresada más adecuada incluye verificar la identidad de secuencia de los residuos canónicos y de interconexión, como también verificar la similitud en las longitudes del bucle de la CDR. La fuente del anticuerpo es también un factor determinante. Se excluyen los anticuerpos previamente humanizados. Para la base de datos NCBI NR, usamos BLAST, y para la búsqueda en la base de datos Kabat se usó FASTA.

20 La cadena ligera expresada más adecuada se halló en la base de datos nr (gi-21669417 (BAC01733); Akahori et al (no publicada, véase el sitio web de NCBI)), que se origina a partir de anticuerpos aislados de una mezcla de tejidos, amígdalas, cordones umbilicales, sangre periférica y médula ósea. La alineación se muestra a continuación:

ES 2 408 704 T3

Alineación entre la cadena ligera de B3F6 y gi-21669417 humano (BAC01733)

»BAC01733 (112 aa)

initn: 447 initl: 447 Opt: 447

Puntaje Smith-Waterman: 447, 61,607% identidad en superposición 112 aa

```

      10      20      30      40      50      60
B3F6 L DFLMTQTPLSLPVSLGDAQASISXXXXXXXXXXXXXXXXXWYLQKPGQSPKLLIYXXXXXX
X ..... :. .... :.....
BAC017 DVVMTQSPFLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHLSNGYNYLDWYLQKPGQSPOLLIIYLGSNRA
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110
B3F6 L XGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVVYXXXXXXXXXFGAGTKLELK (SEQ ID
NO:39)
..... :... :...X
BAC017 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID
NO:45)
      70      80      90     100     110

```

5

La cadena pesada más adecuada se halló en la base de datos nr (gi-14289106 (AAK57792); Salcedo et al. (2002)), que se origina a partir de un conjunto policlonal de linfocitos B en una linfoproliferación benigna. La alineación se muestra a continuación:

Alineación entre la cadena ligera de B3F6 y gi-14289106 humano

10 »gi 14289106 gb AAK57792.1 cadena pesada de inmunoglobulina (120 aa)

initn: 395 initl: 395 opt: 397

Puntaje Smith-Waterman: 397; 53,782% identidad en superposición 119 aa

```

      10      20      30      40      50      60
B3F6 H QVQLQQVGAELVKPGASVKLSCKASGYTFYXXXXXXXXVVKQRPGQGLEWIGXXXXXXXXXXXXX
.X:: . :... :..... :... :.....
gi|142 EVQLVESGAEVKPKPGASVKVSKASGYTFYGFYFMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNY
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110
B3F6 H XXXXXXKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSRXXXXXXXXXXXXXWGQTSVTVSS
(SEQ ID NO:40)
..... : : :..... : :..... :... :... X
gi|142 AQKFQGRVTLTRDTSISTAYMELSRIRSDDTAVYYCARLDTAIDAFDIWGQTMVTVCSN
(SEQ ID NO:46)
      70      80      90     100     110     120

```

15

Ambas secuencias expresadas humanas se buscaron en la base de datos de secuencias de línea germinal en NCBI, y esto resultó en las siguientes líneas germinales seleccionadas: A3*/A19* para la cadena ligera (BAC01733), y VH1-2* para la cadena pesada (AAK57792).

20

Los residuos de marco humano seleccionados se seleccionaron para retromutación al correspondiente residuo de ratón. Se dio preferencia a retener los residuos canónicos, los residuos de relleno de interconexión y los residuos murinos inusuales, que están próximos al sitio de unión. Asimismo, los residuos dentro de 6 Å de cualquiera de los residuos de la CDR se analizaron detalladamente para efectos potenciales sobre la conformación de las CDR.

En una versión de la cadena ligera de B3F6 humanizado, V en la posición 2 se cambió a F. El aminoácido en esta posición se identificó como importante dado que interactúa con L93 (CDR-L3). Esta CDR está implicada en la unión del péptido derivado del antígeno.

Usando esta metodología, se preparó una versión de la cadena ligera:

Versión L1 de la cadena ligera (1 retromutación)

DFVMTQSP~~L~~S LPVTPGEPAS ISCRSSQSIV HSN~~G~~NTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYK~~V~~SNRF
SGV~~P~~DRFSGS GSGTDF~~T~~LKI SRVEAEDVGV YYCFQGS~~H~~V~~P~~ LTFGQGT~~K~~L~~E~~ IK (SEQ ID
 NO: 47)

5 Los siguientes residuos de aminoácidos se seleccionaron para retromutación potencial en la cadena pesada B3F6 humanizada: la M en la posición 48, la V en la posición 67, la R en la posición 71, la T en la posición 73, la A en la posición 93 y la C en la posición 112.

La M en la posición 48 se determinó próxima a CDR-H2, pero no próxima al antígeno del péptido. Se retuvo en una versión de la cadena pesada humanizada y se retromutó a una I en otra versión.

10 La V en la posición 67 se determinó próxima a CDR-H2, pero no próxima al antígeno del péptido. Se retuvo una versión de la cadena pesada humanizada y se retromutó a una A en otra versión.

La R en la posición 71 se determinó canónica. Se retromutó a una V en ambas versiones.

La T en la posición 73 se determinó próxima a CDR-H2, pero no próxima al antígeno del péptido. Se retuvo en una versión de la cadena pesada humanizada y se retromutó a una K en otra versión.

15 La A en la posición 93 se determinó en un residuo de interconexión sin cadena lateral obvia Se retuvo en una versión de la cadena pesada humanizada y se retromutó a una S en otra versión.

La C en la posición 112 se determinó que era un residuo humano inusual. Se retromutó a una S en ambas versiones.

Usando esta metodología, se prepararon dos versiones de la cadena pesada: la versión H1 de la cadena pesada (6 retromutaciones)

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIEWVROA PGQGLEWIGE NDP~~S~~NGRTNY
NEKFKNRaTL TvDkSISTAY MEL~~S~~R~~L~~R~~S~~DD TAVYYCsRGP NYFY~~S~~MDYWG QGTMTVsS (SEQ
 ID NO: 48)

20

Versión H2 (2 retromutaciones)

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIEWVROA PGQGLEWMGE NDP~~S~~NGRTNY
NEKFKNRvTL TvDTSISTAY MEL~~S~~R~~L~~R~~S~~DD TAVYYCaRGP NYFY~~S~~MDYWG QGTMTVsS (SEQ
 ID NO: 49)

Ejemplo 15. Preparación de formas humanizadas adicionales del anticuerpo anti-Cripto B3F6

25 Usando un método basado en el conocimiento (buscando en bases de datos de otros anticuerpos humanizados para determinar los cambios de secuencias que se toleran) se preparó otra versión de la cadena ligera que comprendía una retromutación en la posición 2 y en la posición 100.

30 La estrategia de humanización se basó en la inspección visual y en el análisis de las secuencias de la región V de acuerdo con los métodos descritos en Rosok et al (Rosok MJ, et al., 1996. J. Biol. Chem. 271:22611-22618). Se identificaron los determinantes canónicos, residuos de superficie y potenciales residuos de contacto. Los potenciales residuos de contacto se observaron y clasificaron ampliamente de acuerdo con la definición estructural de los bucles de CDR según lo definido por Chothia et al. (Chothia C y Leak AM. 1987. J. Mol. Biol. 196: 901-917), hipervariabilidad de secuencias según lo definido por Kabat et al. (Kabat EA, Wu TT, Reid-Miller M, Parry HM y Gottesman KS. 1987. Sequences of Protein of Immunological Interest, U.S. department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, MD) y residuos de contacto de antígenos potenciales según lo definido por MacCallum et al. (MacCallum RM, Martin ACR y Thorton JM. 1996. J. Mol. Biol. 262:732-745). Los bucles de CDR murinos, de
 35

acuerdo con la numeración y la definición de Kabat, se injertaron en su totalidad en el marco humano aceptor. Se identificaron residuos de relleno según lo definido por Padlan (Padlan EA. 1991. Mol Immunol. 28: 489-498) y se intentó conservarlos de acuerdo con la estrategia descrita en Singer et al. (Singer II et al. 1993. J. Immunol. 150:2844-2857). A cada residuo en la secuencia de marco se le asignó una "posición de riesgo" bajo, medio o alto para la humanización de los anticuerpos según lo descrito en Harris and Bajorath (Harris L y Bajorath J. 1995. Protein Science 4:306-310).

En general, las posiciones de bajo riesgo se mantuvieron humanas. Para muchas de las posiciones de aminoácidos de medio y alto riesgo no idénticas se hizo referencia a colecciones de anticuerpos humanizados y se consideró si la inclusión de un residuo de aminoácido humano o murino (retromutación) resultaba en actividad de unión funcional. En aquellos casos en los que una sustitución se considera un mapa de sustitución de aminoácidos (D. Bordo y P. Argos. 1991. J. Mol. Biol. 217:721-729) para confirmar la intercambiabilidad funcional de los residuos.

Usando esta metodología, se preparó una versión de la cadena ligera. La secuencia de la cadena ligera se expone a continuación:

Versión L2 de la cadena ligera:

**DEVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRF
**SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSHVPTFGAGTKLE IK (SEQ ID
NO: 50)****

Se preparó otra versión de la cadena ligera que comprendía una retromutación en las posiciones 1, 48, 71, 81, 82b y 112:

Usando esta metodología, se preparó una versión de la cadena pesada. La secuencia de la cadena pesada se expone a continuación:

**qVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIEWVRQA PGQGLEWIGE NDPSNGRTNY
**NEKFKNRVTL TVDTSISTAY MHLSSLRSDD TAVYYCARGP NYFYSMDYWG QGIMVTVS (SEQ
ID NO: 51)****

Las versiones anotadas de las secuencias de B3F6 humanizado injertadas a la CDR y aquellas que comprenden retromutaciones se indican en la Figura 5 para la cadena ligera y en la Figura 6 para la cadena pesada. También se ilustra la numeración Kabat de las posiciones en las que se realizaron retromutaciones.

Ejemplo 16. Preparación de anticuerpos anti-Cripto B3F6 humanizados de longitud total

Se prepararon seis anticuerpos B3F6 humanizados de longitud total y seis anticuerpos B3F6 humanizados que carecían del dominio, teniendo las siguientes combinaciones de cadenas pesada y ligera humanizadas:

Versión 1 de longitud total – versión de cadena ligera de B3F6 humanizada (hu) L1/versión de cadena pesada H1 (L1/H1)

Versión 2 de longitud total - huB3F6 L1/H2

Versión 3 de longitud total - huB3F6 L1/H3

Versión 4 de longitud total - huB3F6 L2/H1

Versión 5 de longitud total - huB3F6 L2/H2

Versión 6 de longitud total - huB3F6 L2/H3

La secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1 que se utilizó para preparar las moléculas de anticuerpo de longitud total se indica en la Figura 7.

Las secuencias de aminoácidos completas de la cadena ligera de B3F6 injertada a la CDR y las versiones L1 y L2 se exponen a continuación:

Cadena ligera de B3F6 injertada a la CDR

DVVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:52)

huB3F6 L1

DFVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:53)

5 huB3F6 L2

DFVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:54)

Las secuencias de aminoácidos completas de la cadena pesada de B3F6 injertada a la CDR y las versiones H1, H2 y H3 para los anticuerpos de longitud total se exponen a continuación:

Cadena pesada de B3F6 de longitud total injertada a CDR

EVQLVESGAIEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGGLEWMGEND
PSNGRTNYNEKFKNRVTLTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGPNYFYS
MDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:55)

10

huB3F6 H1

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWIGENDP
SNGRRTNYNEKFKNRATLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCSRGPNYFYSM
DYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:56)

huB3F6 H2

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGEND
PSNGRRTNYNEKFKNRVTLTVDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGPNYFYSS
MDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:57)

huB3F6 H3

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWIGEND
PSNGRRTNYNEKFKNRVTLTVDTSISTAYMHLSSLRSDDTAVYYCARGPNYFYSS
MDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:58)

5

A partir de cultivos heterogéneos estables, el anticuerpo humanizado de longitud total de la versión 2 (que comprendía la cadena ligera de la versión 1 y la cadena pesada de la versión 2) produjo la mayor cantidad de anticuerpo y tuvo una afinidad de unión comparable con el anticuerpo de ratón original.

Ejemplo 17. Preparación de anticuerpos anti-Cripto B3F6 humanizados que carecen de dominio

Se prepararon seis anticuerpos B3F6 humanizados que carecían del dominio CH2, que tenían las siguientes combinaciones de cadenas pesada y ligera humanizadas:

5 Versión 1 que carece del dominio (dd) – versión 1 de la cadena ligera de B3F6 humanizado que carece de dominio/versión 1 de la cadena pesada (L1/H1)

ddVersión 2 - huddB3F6L1/H2

ddVersión 3 - huddB3F6L1/H3

ddVersión 4 - huddB3F6L2/H1

ddVersión 5 - huddB3F6L2/H2

10 ddVersión 6 - huddB3F6L2/H3

La secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada que se usó para preparar las moléculas de anticuerpo que carecen de dominio se indica en la Figura 7.

Las secuencias de aminoácidos completas de las versiones de cadena ligera y cadena ligera de B3F6 injertadas a la CDR L1 y L2 utilizadas para preparar los anticuerpos que carecen del dominio se exponen a continuación:

15 Cadena ligera de B3F6 injertada a la CDR

**DVVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:52)**

huB3F6L1

**DFVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:53)**

huB3F6 L2

**DFVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:54)**

20 Las secuencias de aminoácidos completas de la cadena pesada de B3F6 injertada a la CDR y las versiones H1, H2 y H3 utilizadas para elaborar los anticuerpos que carecen de dominio se exponen a continuación:

Cadena pesada de B3F6 que carece de dominio CH2 injertada a la CDR

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGEND
PSNGRRTNYNEKFKNRVTLTRDTSISTA YMELSRRLRSDDTAVYYCARGPNYFY S
MDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPEPKSCDTPPCPRCPAPGGGSSGGGSGGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:59)

huB3F6H1

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWIGENDP
SNGRRTNYNEKFKNRATLTVDKSISTA YMELSRRLRSDDTAVYYCSRGP NYFY SM
DYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPEPKSCDTPPCPRCPAPGGGSSGGGSGGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:60)

5 huB3F6 H2

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGEND
PSNGRRTNYNEKFKNRVTLTV DTSISTA YMELSRRLRSDDTAVYYCARGPNYFY S
MDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPEPKSCDTPPCPRCPAPGGGSSGGGSGGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:61)

huB3F6H3

**QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWIGEND
 PSNGRTNYNEKFKNRVTLTVDTSISTAYMHLSSLRSDDTAVYYCARGPNYFYS
 MDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPKPCDTTPPCPRCPAPGGGSSGGGSGGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID NO:62)**

5 Se ensayó la actividad de unión de las seis versiones de los anticuerpos que carecen del dominio (sin incluir los anticuerpos injertados a la CDR). En síntesis, se desarrollaron células de adenocarcinoma de colon humano GEO en DMEM, 10% FBS con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 0,5 mM, penicilina/estreptomicina y aminoácidos no esenciales. Las células se eliminaron del matraz usando PBS, EDTA 20 mM, se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 min y se resuspendieron en PBS, azida al 0,02%, BSA al 0,1%. Se mezclaron anticuerpos humanizados o quiméricos en diversas concentraciones con una concentración final de B3F6 murino de 5 nM en placas de fondo en V de polipropileno. Se añadieron un millón de células GEO a cada placa, y las células se incubaron con los anticuerpos a 4° C durante dos horas. Las células se lavaron con tampón FACS tres veces y se incubaron con una dilución 1:500 de conjugado de ficoeritrina de IgG anti-murina durante una hora a 4° C. Las células se lavaron una vez más, se fijaron en 3% formaldehído y se pasaron por un instrumento FACScalibur. Se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI) contra la concentración de anticuerpo humanizado o quimérico. La CI_{50} se determinó con un ajuste de cuatro parámetros. En cada experimento, la CI_{50} para cada anticuerpo humanizado se comparó con el anticuerpo quimérico en ese experimento. Los resultados se indican en la Tabla 9 a continuación:

15 Tabla 9

Anticuerpo	CI_{50} (nM)
dd-B3F6 quimérico (experimento 1)	23
dd-B3F6 Versión 1	21
dd-B3F6 Versión 2	26
dd-B3F6 quimérico (experimento 2)	15
dd-B3F6 Versión 3	63
dd-B3F6 Versión 4	18
dd-B3F6 Versión 5	32
dd-B3F6 Versión 6	43

Ejemplo 18. El anticuerpo B3F6 humanizado conjugado a una toxina es eficaz en inhibir el desarrollo de células de cáncer de mama humanas en un modelo *in vivo*

Se emplearon los siguientes materiales y métodos en este ejemplo:

Ratones

20 Se incorporaron al estudio ciento cuarenta (140) ratones atímicos hembra (Harlan Sprague Dawley, Madison, WI) de diez semanas de vida. Los animales fueron aclimatados al laboratorio durante por lo menos cinco días antes de la implantación del tumor. El alojamiento consistió en estantes de jaulas ventiladas, y recibieron agua y alimento a voluntad.

Modulo de tumor

25 Se obtuvieron tumores BT-474 de fragmentos de tumores sólidos crio conservados de una línea donante *in vivo* con pases sucesivos establecida en Biogen Idec (crio reg. núm. 0141, establecida originalmente a partir de células obtenidas de American Tissue Type Collection (Manassas, VA)). Los fragmentos de tumor se extrajeron de la crio

conservación y se realizaron pases sucesivos *sc in vivo* para 3 generaciones en ratones atímicos hembra antes de la implantación para este estudio. Se realizaron cultivos bacterianos en muestras del tejido tumoral que se implantó en los ratones. Los cultivos de bacteriología fueron negativos para contaminación bacteriana 24 y 48 horas después del implante del Día 1, a los ratones se les implantaron chips de identificación animal Biomédicas (Modelo IMI-1000; Wexford, DE) *sc* en el flanco izquierdo. En el Día 0, los tumores de ocho animales donantes se cosecharon, se desbridaron de tejido necrótico, se cortaron, y se implantaron fragmentos de 3mm³ de los tumores BT-474 *sc* en el área del flanco derecho de cada ratón. Las mediciones del tamaño del tumor y el peso corporal se registraron por lo menos semanalmente, comenzando en el Día 5. Cuando los tumores midieron un mínimo de 100 mg (Día 15), se aleatorizaron a grupos de tratamiento y control (véase la Tabla 10) en base al tamaño del tumor y excluyendo tumores sin crecimiento progresivo.

Tabla 10: Grupos control y de tratamiento de ensayo

Agente	Dosis/inyección	Dosis equivalente de maitansina (µg/kg)	Ruta	Esquema	Núm. de ratón
Vehículo control	10 ml/kg	0	IV ^a	q7dx3	16
B3F6.1-DM4	15 mg/kg	266	IV	q7dx3 más Día 43	8
B3F6.1-DM4	15 mg/kg	266	IV	q7dx3	8
	25 mg/kg	418	IV	Día 43	
B3F6.1-DM4	35 mg/kg	620	IV	q7dx3	8
B3F6.1-DM4	35 mg/kg	620	IV	Días 15, 22, 33, 36	
Taxol	25 mg/kg		IP ^b	q4dx3	

^a intravenosa

^b intraperitoneal

Artículos de ensayo y agente quimioterapéutico positivo

Se prepararon conjugaciones de maitansina DM4 (2000-67 3.5 D/A, 6mg/ml y 2000-79, 3.3 D/A, 5.5 mg/ml) en ImmunoGen, Inc (Cambridge, MA) con tecnología de Profármaco Activado por el Tumor (TAP) de ImmunoGen. En todos los experimentos, los anticuerpos B3F6 se conjugaron con un promedio de 3-4 moléculas DM4 por anticuerpo. Como ejemplo de la cantidad de DM4 administrada, una dosis de 23 mg/kg de anticuerpo conjugado B3F6 -DM4 con un promedio de 3DM4/mAb correspondería a aproximadamente 350ug/kg de DM4. Se obtuvo TaxolTM de grado clínico (inyección de paclitaxel, NDC 0015-3476-30) de Bristol-Myers Squibb (Lote núm. 4L83460, venc. nov. de 2007).

Grupos de estudio y regímenes de tratamiento

Los grupos de estudio y los regímenes de tratamiento se describen en la Tabla 10. El vehículo control (tampón de citrato 10mM, pH 5,5, cloruro de sodio 135 mM) se administró *iv* una vez por semana por tres dosis (q7dx3) y TaxolTM se administró *ip* cada 4 días por 3 dosis (q4dx3). B3F6.1-DM4 por 15 mg/kg se administró *iv* q7dx3 más una dosis adicional en el Día 43 o q7dx3 más una dosis de 25 mg/kg en el Día 43. B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg se administró *iv* q7dx3 o en los Días 15, 22, 33 y 36. Todos los tratamientos comenzaron en el Día 15.

Evaluación de actividad neoplásica

Las mediciones de los tumores se determinaron usando calibradores digitales. Las mediciones de los pesos corporales y de los tamaños de los tumores se registraron en el Día 0 y continuaron dos veces por semana hasta la finalización del estudio. La fórmula para calcular el volumen para un elipsoide alargado se utilizó para estimar el volumen del tumor (mm³) de dos mediciones del tumor bidimensionales: Volumen del tumor (mm³) = (Longitud x Ancho²)÷2. Suponiendo una densidad unitaria, el volumen se convirtió a peso (es decir, un mm³ = un mg).

En el Día 58, los grupos tratados con vehículo control, Taxol y B3F6.1-DM4 por 15 mg/kg/iny fueron sacrificados. Se siguió capturando semanalmente el peso del tumor y el peso corporal en el resto de los grupos. El grupo tratado con B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg/iny q7dx3 se sacrificó en el Día 76. El grupo tratado con B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg/iny en los Días 15, 22, 33 y 36 se sacrificó en el Día 83, cuando el estudio finalizó.

5 Análisis estadístico

Se realizó la prueba de la *t* de Student en los pesos de los tumores de la media al final de cada estudio para determinar si había alguna diferencia significativa entre cada grupo de tratamiento y el grupo del vehículo control.

10 Hubo un 98% de índice de aumento del tumor después de la implantación, y los ratones dentro de un intervalo de tamaño estricto se seleccionaron para iniciar los tratamientos. El crecimiento del tumor en el grupo del vehículo control estuvo dentro del intervalo típico que observamos con este modelo. Taxol produjo una respuesta coherente con este modelo, dando como resultado una inhibición significativa ($P < 0,05$) del crecimiento del tumor desde el Día 26 hasta el Día 50. En el Día 58, los grupos tratados con vehículo control, Taxol y B3F6.1-DM4 por 15 mg/kg/iny fueron sacrificados. Se siguió capturando semanalmente el peso de los tumores y el peso corporal del resto de los grupos. El grupo tratado con B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg/iny q7dx3 se sacrificó en el Día 76. El grupo tratado con B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg/iny en los Días 15, 22, 33 y 36 se sacrificó en el Día 83, cuando finalizó el estudio.

20 Las Figuras 10-13 indican el efecto de dos dosis (15 y 35 mg/kg/iny) de B3F6.1-DM4 administrado iv en varios regímenes sobre el peso del tumor, % Ensayo/Control (%T/C) y peso corporal en ratones atímicos que portan los tumores de xenoinjerto BT-474 consolidados. B3F6.1-DM4 por 15 mg/kg/iny administrado iv q7dx3 más y una dosis adicional en el Día 43 inhibieron significativamente ($P < 0,05$) el crecimiento del tumor entre el Día 33 y el Día 47, pero ya no demostraron una inhibición significativa cuando este grupo finalizó en el Día 58. La otra cohorte tratada con B3F6.1-DM4 por 15 mg/kg/iny, administrados iv q7dx3 y por 25 mg/kg/iny en el Día 43, no demostró una inhibición significativa del crecimiento del tumor durante el estudio. Ambos regímenes de dosificación de B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg/iny resultaron en una inhibición estadísticamente significativa ($P < 0,001$) del crecimiento del tumor desde el Día 29 hasta el Día 58, cuando finalizó el grupo del Vehículo Control.

25 El %T/C para ambas cohortes tratadas con B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg/iny disminuyó por debajo de los criterios del NCI para actividad de 42% alrededor del Día 29 y permaneció debajo de este nivel durante todo el estudio. El %T/C de las cohortes tratadas con B3F6.1-DM4 por 15 mg/kg nunca estuvo debajo de 42%.

Observaciones clínicas

30 Varios ratones tratados con B3F6.1-DM4 experimentaron infecciones bacterianas corineformes leves en la piel. Estas bacterias residen en la piel y se consideran una infección oportunista que puede ocurrir si el animal está estresado. La mayoría de los ratones tratados con B3F6.1-DM4 por 35 mg/kg/iny desarrollaron infecciones alrededor del Día 29, y todas las infecciones se resolvieron (excepto núm. 33) alrededor del Día 43.

35 Un ratón tratado con Taxol experimentó adelgazamiento debido a una falla técnica durante la administración de Taxol. Se sabe que Taxol causa toxicidad gastrointestinal, y deben tomarse precauciones al administrar este agente citotóxico ip. La administración de fluidos sc no mejoró el estado del ratón, y fue sacrificado en el Día 26, tres días después de recibir su última dosis de Taxol, conforme a los lineamientos IACUC con respecto a adelgazamiento (eutanasia cuando la pérdida de peso excede 20%). Los datos de este animal se excluyen de los gráficos y del análisis estadístico.

40 Un ratón tratado con B3F6.1-DM4, 35 mg/kg/iny q7dx3 experimentó adelgazamiento comenzando en el Día 26. El adelgazamiento continuó hasta que el ratón tuvo que ser sacrificado en el Día 43, 14 días después de recibir su última dosis de B3F6.1-DM4, conforme a los lineamientos IACUC. La autopsia reveló fluido subcutáneo claro en el tórax. No se sabe si el adelgazamiento tuvo relación con el tratamiento, ya que solamente un ratón más en este grupo experimentó adelgazamiento leve. No obstante, el núm. 35 también experimentó una infección bacteriana corineforme, que puede haber resultado en una pérdida de peso corporal leve.

45 En el Día 50, un ratón del grupo vehículo control fue sacrificado, conforme a los lineamientos IACUC, ya que su tumor había alcanzado un peso mayor que 20% de su peso corporal. Otro ratón en el grupo vehículo control fue sacrificado en el Día 50 debido a una úlcera severa del tumor y a pérdida de peso corporal. Los pesos de los tumores para estos ratones se transfirieron a los datos para el resto del estudio.

50 Ejemplo 19. El anticuerpo B3F6 que carece de dominio humanizado conjugado a una Toxina es eficaz para inhibir el desarrollo de células de cáncer de mama en un modelo *in vivo*

Se utilizaron los siguientes materiales y métodos en este ejemplo:

Animales:

5 Se incorporaron en el estudio 135 ratones atímicos, hembra de Harlan Sprague Dawley (Madison, WI.) de 6-7 semanas de vida. Los animales fueron aclimatados al laboratorio durante por lo menos 5 días antes de la implantación del tumor. A los animales se les implantaron individualmente chips de identificación animal antes de la implantación del tumor. Se incluyeron 8 animales en el grupo de ensayo y 20 animales en el grupo del vehículo control.

Tumor:

10 La línea celular *in vitro* BT-474 se obtuvo originalmente del Depósito de Tumores del NCI. Se estableció una línea donante *in vivo* trasplantada en serie (de Biogen Idec crio reg. núm 0141 (sin enriquecimiento de estrógenos) en Biogen Idec y se trasplantó para 4 generaciones en ratones atímicos hembra antes de la implantación en este estudio.

A los animales se les implantó un fragmento de 3mm³ de tejido/ratón por vía subcutánea en el área del flanco derecho.

15 Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño mínimo de 100 mg. Los animales se aleatorizaron a los siguientes grupos de ensayo y control:

Tabla 11.

Group número	Tratamiento**	Núm. de ratón
1.	Vehículo Control, 0,2 ml/ratón, iv., 2x/día por 5 dosis (tampón de citrato 20mM, pH 5,5, 16 cloruro de sodio 135 mM)	
2.	Agente quimioterapéutico positivo, Taxol, 25,0 mg/kg/iny. ip. q4dx3	8
3.	ddB3F6.1- DM4, 18,0 mg/kg/iny, iv., 2x/día por 5 dosis (3,5 DM4/mAb)	8
4.	ddB3F6.1-DM4, 10,0 mg/kg/iny, i.v., 2x/día por 5 dosis (3,5 DM4/mAb)	8
5.	dtiB3F6.1- DM4, 3,0 mg/kg/iny, iv., 2x/día por 5 dosis (3-5 DM4/mAb)	8
6.	ddB3F6.1 mAb desnudo, 18,0 mg/kg/iny, iv., 2x/día por 5 dosis	8

Nota: ** Las dosis se basan en la dosis de 23 mg/kg = 3 fármacos /mAb proporcionando a los animales 350 ug/kg de maitansina (MTD).

El esquema del ensayo fue:

20 Día -1: Se implantaron los chips de identificación de los animales y se registraron los pesos corporales iniciales.

Día 0: Los tumores se cosecharon, se implantaron, y los ratones se aleatorizaron. Se realizaron cultivos bacterianos en el tumor.

Día 4: Se registraron las mediciones del tamaño del tumor para estadificación de los tumores y se siguió registrando o bien diariamente o día por medio hasta el día de la estadificación.

25 Se seleccionaron los ratones con tumores que medían un tamaño mínimo de 100 mg. Los ratones fueron aleatorizados y se registraron los pesos corporales. Los tratamientos se administraron como una dosis iv individual. El agente de control positivo se administró i.p. en un esquema de q4dx3.

Se registraron los pesos corporales y las mediciones de los tumores en el día de la estadificación y se siguieron registrando 2 veces por semana hasta la finalización del estudio.

Los datos en las Figuras 14-17 demuestran que el B3F6 que carece de dominio fue eficaz para reducir el peso del tumor en ratones tratados con determinadas concentraciones de la molécula que carece de dominio.

Ejemplo 20. El anticuerpo B3F6 humanizado conjugado a una Toxina es eficaz para inhibir el desarrollo de células cancerosas testiculares humanas en un modelo *in vivo*

- 5 En el siguiente Ejemplo, el anticuerpo monoclonal de igG1 humanizado anti-Cripto (mAb) B3F6 (también denominado B3F6.1) se conjugó con DM4, un derivado del agente citotóxico maitansina, (B3F6.1-DM4). Este conjugado se evaluó para evidencia de actividad antineoplásica en ratones atímicos macho que portaban xenoinjertos establecidos implantados subcutáneamente del carcinoma de testículo humano NCCIT. Las cohortes de animales se trataron con B3F6.1-DM4 mAb por vía intravenosa (iv) por 6, 10, 15 y 25 mg/kg/inyección (equivalentes a 100, 178, 266 y 444 ug/kg maitansina, respectivamente) una vez por semana para tres dosis (q7dx3) o por 25 y 10 mg/kg/inyección en el Día 15 y en los días posteriores dependiendo del recrecimiento del tumor, un vehículo control iv q7dx3, o cis-platino (control quimioterapéutico positivo) por 2 mg/kg/inyección sc tres veces por semana por 6 dosis (3x/sem x6). Los tratamientos se iniciaron en el Día 15 cuando los tumores habían alcanzado un cambio mínimo en tamaño de 100 mg.
- 10 mg/kg/inyección en el Día 15 y en los días posteriores dependiendo del recrecimiento del tumor, un vehículo control iv q7dx3, o cis-platino (control quimioterapéutico positivo) por 2 mg/kg/inyección sc tres veces por semana por 6 dosis (3x/sem x6). Los tratamientos se iniciaron en el Día 15 cuando los tumores habían alcanzado un cambio mínimo en tamaño de 100 mg.
- 15 Los resultados indican que el crecimiento del tumor en el grupo del vehículo control estuvo dentro de los límites aceptables para este modelo. Cis-platino produjo una inhibición significativa ($P < 0,05$) del crecimiento del tumor, coherente con este modelo, desde el Día 20 hasta el Día 66. B3F6.1- DM4 administrado q7dx3 produjo una regresión de los tumores a 10 ($P < 0,001$), 15 ($P < 0,001$) y 25 mg/kg/iny ($P < 0,001$) comenzando en el Día 20 y que siguió hasta la finalización del estudio en el Día 107. B3F6.1-DM4 por 6 mg/kg/iny q7dx3 provocó la regresión de los tumores desde el Día 20 hasta el Día 44 e inhibió significativamente ($P < 0,001$) el crecimiento de los tumores hasta que finalizó el grupo en el Día 70. B3F6.1-DM4 administrado una vez en el Día 15 por 25 mg/kg produjo la regresión de los tumores durante todo el estudio ($P < 0,001$). B3F6.1-DM4 administrado una vez en el Día 15 por 10 mg/kg causó la regresión inicial de los tumores ($P < 0,001$). Dosis adicionales de 10 mg/kg administradas en los días 37 y 44 provocaron regresión ($P < 0,01$) de los tumores que habían comenzado a crecer nuevamente. En conclusión, B3F6.1-DM4 en los regímenes de dosis ensayados fue altamente eficaz contra xenoinjertos establecidos del carcinoma de testículo NCCIT.
- 20 mg/kg/iny q7dx3 provocó la regresión de los tumores desde el Día 20 hasta el Día 44 e inhibió significativamente ($P < 0,001$) el crecimiento de los tumores hasta que finalizó el grupo en el Día 70. B3F6.1-DM4 administrado una vez en el Día 15 por 25 mg/kg produjo la regresión de los tumores durante todo el estudio ($P < 0,001$). B3F6.1-DM4 administrado una vez en el Día 15 por 10 mg/kg causó la regresión inicial de los tumores ($P < 0,001$). Dosis adicionales de 10 mg/kg administradas en los días 37 y 44 provocaron regresión ($P < 0,01$) de los tumores que habían comenzado a crecer nuevamente. En conclusión, B3F6.1-DM4 en los regímenes de dosis ensayados fue altamente eficaz contra xenoinjertos establecidos del carcinoma de testículo NCCIT.
- 25 mg/kg/iny q7dx3 provocó la regresión de los tumores desde el Día 20 hasta el Día 44 e inhibió significativamente ($P < 0,001$) el crecimiento de los tumores hasta que finalizó el grupo en el Día 70. B3F6.1-DM4 administrado una vez en el Día 15 por 25 mg/kg produjo la regresión de los tumores durante todo el estudio ($P < 0,001$). B3F6.1-DM4 administrado una vez en el Día 15 por 10 mg/kg causó la regresión inicial de los tumores ($P < 0,001$). Dosis adicionales de 10 mg/kg administradas en los días 37 y 44 provocaron regresión ($P < 0,01$) de los tumores que habían comenzado a crecer nuevamente. En conclusión, B3F6.1-DM4 en los regímenes de dosis ensayados fue altamente eficaz contra xenoinjertos establecidos del carcinoma de testículo NCCIT.

Se emplearon los siguientes Materiales y Métodos en este ejemplo

Ratones

- 30 Se incorporaron al estudio ciento cincuenta (150) ratones atímicos macho (Harlan Sprague Dawley, Madison, WI) de siete u ocho semanas de vida. Los animales fueron aclimatados al laboratorio durante por lo menos cinco días antes de la implantación del tumor. El alojamiento consistió en estantes con jaulas ventiladas, y tuvieron agua y alimento a voluntad.

Modelo de tumor

- 35 Se obtuvieron células de NCCIT de American Tissue Type Collection (Manassas, VA). La línea celular se pasó *in vitro* 4 veces antes de la implantación. Las células se desarrollaron *in vitro* en medio RPMI-1640 + 10% suero bovino fetal (FBS) sin antibiótico (5% CO₂). Se realizaron cultivos bacterianos en alícuotas de la preparación de homogeneizado celular que se implantó en el ratón. Los cultivos de bacteriología fueron negativos para contaminación bacteriana 24 y 48 horas post-implante

- 40 En el Día -1, a los ratones se les implantaron chips de identificación animal BioMedics (Modelo IMI-1000; Seaford, DE) por vía subcutánea en el flanco izquierdo. Se implantó un inóculo de 5×10^6 células NCCIT en 200 L RPMI-1640 sin suero (25%) más Matrigel (75%) sc en el área del flanco derecho en el Día 0. Las mediciones del tamaño del tumor y del peso corporal se registraron por lo menos dos veces por semana, comenzando en el Día 6. En el Día 15, los ratones con tumores con un incremento mínimo en el peso del tumor de 100 mg y un incremento máximo de 244 mg, excluyendo tumores con crecimiento no progresivo, se aleatorizaron a los grupos de tratamiento y control (véase la Tabla 12). El cambio en el peso del tumor desde la primera medición del tumor (Día 6) se usó para evaluar el crecimiento del tumor, en lugar del peso del tumor real, para justificar el volumen de Matrigel en el inóculo.
- 45 mg, excluyendo tumores con crecimiento no progresivo, se aleatorizaron a los grupos de tratamiento y control (véase la Tabla 12). El cambio en el peso del tumor desde la primera medición del tumor (Día 6) se usó para evaluar el crecimiento del tumor, en lugar del peso del tumor real, para justificar el volumen de Matrigel en el inóculo.

Artículos de ensayo y agente quimioterapéutico positivo

- 50 Se prepararon conjugaciones de DM4 (2000-67,6.0 mg/ml) en ImmunoGen, Inc (Cambridge, MA) con tecnología de Profármaco Activado por el Tumor (TAP) de ImmunoGen. El Vehículo Control y las disoluciones de dosificación de B3F6.1-DM4 mAb (Lote núm 11155-104, formulación, anotación: LC11155-104) fueron provistos por Ling Ling Chen en Biogen Idec. Se obtuvo Platinol-AQ de grado clínico (inyección de cisplatino, NDC 0015-3221-22) de Bristol-Myers Squibb (Lote núm 2C65556, venc. marzo de 2003).

Grupos de estudio y regímenes de tratamiento

Los grupos de estudio y los regímenes de tratamiento se describen en la Tabla 12. B3F6.1-DM4 tiene una semivida de 3,9 días en ratones atímicos. B3F6.1-DM4 mAbs se administraron por vía intravenosa (IV) o bien una vez por semana durante tres dosis (q7d x 3) o en el Día 15 y en días subsiguientes dependiendo del recrecimiento del tumor.

5 El vehículo control (tampón de citrato 10mM, pH 5,5, cloruro de sodio 135 mM) se administró iv q7d x 3 y cis-platino se administró sc tres veces por semana durante seis dosis (3x/sem x 6). Todos los tratamientos comenzaron en el Día 15.

La Tabla 12 demuestra los Grupos de Control y de Tratamiento del ensayo

Grupos Control y Tratamiento del ensayo

Agente	Dosis/inyección	Dosis equivalente de maitansina (ug/kg)	Ruta	Esquema	Núm. de ratones
Vehículo control	10 ml/kg	0	IV ^a	q7dx3	16
B3F6.1-DM4	6 mg/kg	100	IV	q7dx3	8
B3F6.1-DM4	10 mg/kg	178	IV	q7dx3	8
B3F6.1-DM4	15 mg/kg	266	IV	q7dx3	8
B3F6.1-DM4	25 mg/kg	444	IV	q7dx3	8
B3F6.1-DM4	10 mg/kg	100	IV	Día 15, Día 37, Día 44	8
B3F6.1-DM4	25mg/kg	444	IV	Día 15	8
cis-platino	2 mg/kg		SC ^b	3x/sem x 6	8

10 Todos los tratamientos comenzaron en el Día 15

^a intravenosa

^b subcutánea

Evaluación de actividad antineoplásica

15 Las mediciones de los tumores se determinaron usando calibradores digitales. Los pesos corporales y las mediciones del tamaño de los tumores se registraron en el Día 6 y continuaron por lo menos dos veces por semana hasta la finalización del estudio. La fórmula para calcular el volumen para un elipsoide alargado se utilizó para estimar el volumen del tumor (mm³) a partir de dos mediciones del tumor bidimensionales: Volumen del Tumor (mm³) = (Longitud x Ancho²) dividido por 2. Suponiendo densidad unitaria, el volumen se convirtió a peso (es decir, un mm³ = un mg).

20 Se usó un cambio en el peso del tumor desde la primera para justificar el volumen de Matrigel en el inóculo.

En el Día 70, los grupos tratados con vehículo control, cis-platino y B3F6.1-DM4 por 6 mg/kg/inj fueron sacrificados. El resto de los grupos continuó recibiendo seguimiento hasta el Día 107, cuando finalizó el estudio.

Análisis estadístico

25 Se realizó la prueba de la *t* de Student en los pesos de los tumores de la media al final de cada estudio para determinar si había habido diferencias significativas entre cada grupo de tratamiento y el grupo del vehículo control.

Avanzado el estudio, algunos ratones en el grupo del vehículo control fueron sacrificados, conforme a los lineamientos IACUC, ya que sus tumores habían alcanzado un peso mayor que 20% de su peso corporal. Los pesos de los tumores finales de estos ratones se transfirieron a los datos hasta el final del estudio.

30 Hubo un 95% de índice de crecimiento del tumor después de la implantación, y los ratones con tumores dentro de un intervalo estricto de cambio en el peso del tumor en el Día 15 se seleccionaron para iniciar los tratamientos. El crecimiento del tumor en el grupo del vehículo control estuvo dentro del intervalo típico observado en este modelo. El cisplatino produjo una respuesta coherente con el modelo, dando como resultado una inhibición significativa (P<0,05) del crecimiento del tumor desde el Día 20 hasta el Día 66. En el Día 70, los grupos tratados con el vehículo

control, cisplatino y B3F6.1-DM4 por 6 mg/kg/iny fueron sacrificados. El resto de los grupos continuó recibiendo seguimiento hasta el Día 107, cuando el estudio finalizó.

5 Las Figuras 18-21 indican el efecto del cuatro dosis (6, 10, 15 y 25 mg/kg/iny) de B3F6.1-DM4 administradas q7dx3 o cis-platino administrado 3x/sem x 6 sobre el cambio del peso del tumor, % Ensayo/Control, y peso corporal en ratones atómicos que portaban los tumores de xenoinjerto NCCIT establecidos. B3F6.1-DM4 administrado q7dx3 produjo una regresión de los tumores a 10 (P<0,01), 15 (P<0,001) y 25 mg/kg (P<0,001) desde el Día 20 hasta el Día 70 (el día en que finalizó el grupo del Vehículo Control). Los tumores en estos grupos permanecieron en regresión hasta el final del estudio en el Día 107. B3F6.1-DM4 por 6 mg/kg/iny administrado q7dx3 provocó la regresión de los tumores desde el Día 20 hasta el Día 44. Después del Día 44, muchos tumores en este grupo comenzaron a crecer nuevamente, no obstante, el crecimiento del tumor se inhibió significativamente (P<0,01) hasta el Día 70, cuando finalizó el grupo.

El %T/C para B3F6.1-DM4 a 6 y 10 mg/kg/iny se redujo debajo de los criterios del NCI para actividad de 42% en el Día 23 y se mantuvo debajo de este nivel durante todo el estudio. El %T/C para el grupo de 25 mg/kg/iny se redujo debajo de 42% alrededor del Día 20 y permaneció por debajo de 10% desde el Día 23 hasta el final del estudio.

15 Las Figuras 22-25 exhiben el efecto de B3F6.1-DM4, 25 mg/kg/iny, administrado una vez en el día 15, B3F6.1, 10 mg/kg/iny, administrado en el Día 15 y posteriormente tras el recrecimiento del tumor (Día 37 y 44), de cisplatino administrado 3x/sem x 6 sobre el cambio del tamaño del tumor, % Ensayo/Control, y peso corporal en ratones atómicos que portan los tumores de xenoinjerto NCCIT establecidos. B3F6.1-DM4, 25 mg/kg/iny administrado una vez en el Día 15 produjo la regresión (P<0,001) de los tumores desde el Día 20 hasta el Día 70 (el día en que finalizó el grupo del Vehículo Control). Los tumores en este grupo permanecieron en regresión hasta la finalización del estudio en el Día 107. B3F6.1-DM4 administrado una vez en el Día 15 por 10 mg/kg causó la regresión inicial de los tumores (P<0,001). Dosis adicionales de 10 mg/kg administradas en el Día 37 y 44 provocaron la regresión (P<0,01) de los tumores que habían comenzado a crecer nuevamente.

25 El %T/C para B3F6.1-DM4 por 10 y 25 mg/kg/iny se redujo por debajo de los criterios del NCI para actividad de 42% alrededor del Día 20 y permaneció debajo de este nivel durante todo el estudio.

30 Varios ratones tratados con B3F6.1-DM4 experimentaron infecciones bacterianas corineformes leves a moderadas de la piel que se resolvieron al cabo de algunos días del inicio. Estas bacterias residen en la piel y se consideran una infección oportunista que puede ocurrir si el animal está estresado. Dos ratones tratados con B3F6.1-DM4 por 25 mg/kg/iny, q7dx3, dos ratones tratados con 25 mg/kg/iny en el Día 15 solamente, y un ratón tratado con 15 mg/kg/iny, q7dx3 exhibieron signos de infección entre los Días 20 — 23. Un ratón tratado con 25 mg/kg/iny, q7dx3 exhibió signos de una infección leve en el Día 30.

En el Día 52, un ratón tratado con B3F6.1-M4, 25 mg/kg/iny una vez en el Día 15 exhibió abdomen distendido y la vejiga no se pudo evacuar. El ratón fue sacrificado y la autopsia reveló un cálculo en la vejiga.

Ejemplo 21. B3F6 humanizado inhibe el desarrollo de células de pulmón humano CLAU-6 en un modelo *in vivo*

35 El propósito de este estudio fue determinar la eficacia de B3F6.1-DM4 conjugado a mAb en el crecimiento de tumores de xenoinjerto de Calu-6 al inicio del tratamiento en una masa tumoral preformada establecida.

Se utilizaron los siguientes Materiales y Métodos en este Ejemplo:

Ratones

40 Se incorporaron al estudio ciento sesenta (160) ratones atómicos hembra (Harlan Sprague Dawley, Madison, WI) de ocho o nueve semanas de vida. Los animales fueron aclimatados al laboratorio durante por lo menos cinco días antes de la implantación del tumor. El alojamiento consistió en estantes de jaulas ventiladas, y los animales recibieron alimento y agua a voluntad.

Modelo de tumor

45 Se obtuvieron células Calu-6 de American Tissue Type Collection (Manassas, VA). La línea celular se pasó *in vitro* 11 veces antes de la implantación. Las células se desarrollaron *in vitro* en medio RPMI-1640 + 10% suero bovino fetal (FBS) sin antibiótico (5% CO₂). Se realizaron los cultivos bacterianos en alícuotas de la preparación de homogeneizado del tumor que se implantó en los ratones. Los cultivos de bacteriología fueron negativos para contaminación bacteriana 24 y 48 horas post-implante.

50 En el Día-1, a los ratones se les implantaron sc chips de identificación de animales BioMedics (Modelo IMI-1000; Seaford, DE) en el flanco izquierdo – Un inóculo de 5 x 10⁶ células Calu-6 en 200 µL RPMI-1640 sin suero se implantó sc en el área del flanco derecho en el Día 0. Se registraron el tamaño del tumor y las mediciones del peso

corporal por lo menos dos veces por semana, comenzando en el Día 4. Cuando los tumores midieron un mínimo de 100 mg, los ratones fueron aleatorizados a los grupos de tratamiento y control (véase Tabla 13).

Artículos de ensayo y agente quimioterapéutico positivo

5 Se prepararon conjugaciones de DM4 (2000-79 3,3 D/A, 5,5 mg/ml) en ImmunoGen, Inc (Cambridge, MA) con tecnología de Profármaco Activado por Tumor (TAP) de ImmunoGen. Las disoluciones de dosificación del Vehículo Control y B3F6.1-DM4 mAb (Lote núm. 10878-49, formulación, anotación: AC 10878-49) fueron proporcionadas por Anne Cheung at Biogen Idec. Se obtuvo Camptosar™ de grado clínico (inyección de irinotecán, NDC 0009-7529-01) de Pharmacia and Upjohn (Lote núm. 76KDP, venc. julio de 2006 durante las primeras 7 dosis, y lote núm. 46MFH, venc. agosto de 2007 durante las últimas 3 dosis).

10 Grupos de estudio y regímenes de tratamiento

15 Los grupos de tratamiento y los regímenes de tratamiento se describen en la Tabla 13. B3F6.1-DM4 tiene una semivida de 3,9 días en ratones atímicos y todos los B3F6.1-DM4 mAbs se administraron iv o bien en el Día 13, 17 y 21 o una vez por semana durante tres dosis (q7dx3). El vehículo control (tampón de citrato 10mM, pH 5,5, cloruro de sodio 135 mM) se administró q7dx3 y el irinotecán se administró ip en el Día 13-14, 17-21 y 24-26. El régimen de dosificación del grupo del vehículo control se equiparó con la dosificación de los grupos de tratamiento no relevantes para este informe, y los primeros tratamientos se administraron en el Día 14. Los tratamientos de B3F6.1-DM4 e irinotecán comenzaron en el Día 13.

Tabla 13: Grupos control y de tratamiento del ensayo

Agente	Dosis/inyección	Dosis equivalente de maitansina (ug/kg)	Ruta	Esquema	Núm. de ratón
Vehículo control	10 ml/kg	0	IV ^a	3x/sem x 4	16
B3F6.1-DM4	10 mg/kg	167	IV	Día 13, Día 17, Día 21	8
B3F6.1-DM4	20 mg/kg	334	IV	Día 13, Día 17, Día 21	8
B3F6.1-DM4	15 mg/kg	251	IV	Q7d x 3	8
B3F6.1-DM4	30 mg/kg	502	IV	Q7d x 3	8
irinotecán	10 mg/kg		IP ^b	Día 13-14, 17-21	

^a intravenosa

20 ^b intraperitoneal

Evaluación de la terapia antineoplásica

25 Las mediciones del tumor se determinaron usando calibradores digitales. Los pesos corporales y las mediciones de los tamaños de los tumores se registraron en el Día 4 y continuaron dos veces por semana hasta la finalización del estudio. La fórmula para calcular el volumen para un elipsoide alargado se utilizó para estimar el volumen del tumor (mm³) de dos mediciones del tumor bidimensionales: Volumen del Tumor (mm³) = (Longitud x Ancho²)÷2. Suponiendo densidad unitaria, el volumen se convirtió a peso (es decir, un mm³ = un mg).

Análisis estadístico

30 Se realizó la prueba de la *t* de Student en los pesos de los tumores de la media al final de cada estudio para determinar si había alguna diferencia estadísticamente significativa entre cada grupo de tratamiento y el grupo del vehículo control.

Actividad antineoplásica

- 5 Hubo un 90% de índice de crecimiento del tumor después de la implantación, y los ratones dentro de un intervalo de tamaño estricto se seleccionaron para iniciar los tratamientos. Irinotecán produjo una inhibición significativa ($P < 0,001$) del tamaño del tumor, coherente con este modelo, desde el Día 20 hasta el Día 45, cuando finalizó el grupo.
- 10 Las Figuras 26-29 demuestran el efecto de dos dosis (10 y 20 mg/kg/iny) de B3F6.1- DM4 administrado iv en el Día 13, 17 y 21 o irinotecán administrado en el Día 13-14, 17-21 y 24-26 sobre el cambio en el peso del tumor, el peso del tumor final, % Ensayo/Control y peso corporal en ratones atímicos que portaban tumores de xenoinjerto de Calu-6 establecidos. B3F6.1-DM4 produjo una inhibición significativa del crecimiento del tumor en ambas dosis por las siguientes duraciones:
- 10 mg/kg en los Días 24 a 45 ($P < 0,01$ Días 24, 35-38 y 45; $P < 0,001$ Días 27-32 y 41)
 - 20 mg/kg en los Días 24 a 45 ($P < 0,001$)
- El %T/C alcanzó los criterios del NCI de actividad debajo de 42 % con 20 mg/kg/iny en los Días 32 a 45.
- 15 Las Figuras 30-33 demuestran el efecto de dos dosis (15 y 30 mg/kg/iny) de B3F6.1- DM4 administrado iv q7dx3 o irinotecán administrado en el Día 13-14, 17-21, y 24-26 sobre el cambio en el peso del tumor, % Ensayo/Control y peso corporal en ratones atímicos que portaban tumores de xenoinjerto de Calu-6 establecidos. B3F6.1-DM4 produjo una inhibición significativa del crecimiento del tumor en ambas dosis durante las siguientes duraciones:
- 15 mg/kg en los Días 32 a 45 ($P < 0,01$ Días 32-35 y 45; $P < 0,001$ Días 38-41)
 - 30 mg/kg en los Días 24 a 45 ($P < 0,01$ Día 24, $P < 0,001$ Días 27-45)
- 20 El %T/C alcanzó los criterios del NCI de actividad debajo de 42 % con 30 mg/kg en los Días 32 a 45.
- Se halló muerto a un ratón en B3F6.1-DM4 por 10 mg/kg/iny en el Día 32 post-implantación, 11 días después de recibir su última dosis de B3F6.1-DM4. El animal no exhibió signos de toxicidad post-dosificación y ninguno de los demás animales del grupo exhibió ninguna enfermedad.
- 25 Los ratones del grupo B3F6.1-DM4, 30 mg/kg/iny experimentaron infecciones bacterianas corineformes de la piel que se resolvieron varios días después de la última dosis de B3F6.1-DM1. Esta bacteria reside en la piel y se considera una infección oportunista que puede ocurrir si el animal está estresado. Todos los animales de este grupo experimentaron 5-15% adelgazamiento durante la dosificación, pero tanto el adelgazamiento como la infección se resolvieron una vez suspendida la dosis. Un ratón de este grupo experimentó también infección secundaria por estafilococos del pabellón auditivo en el oído derecho, que se resolvió al cabo de varios días.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biogen IDEC MR, Inc. et al.

5 <120> PURIFICACIÓN Y SÍNTESIS PREFERENCIAL DE MOLÉCULAS DE UNIÓN

<130> BGNA019CPPC

<150> 60/641691

10 <151> 05-01-2005

<160> 71

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15 <210> 1

<211> 1095

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

25

```

cagggtccaac tgcagcaggt tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tacactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggagag aatgatocta gcaacggtcg tactaactac 180
aatgagaagt tcaagaacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgttc aaggggacct 300
aattacttct attctatgga ctactggggt calaggaacct cagtcacctg ctctcagct 360
agcaccaagg gccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgac accttccgg ctgtcctaca gtctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgccagagc ccaaatcttg tgacacacct 720
ccccatgcc cacggtgccc agcacctgga ggtggctcga gtggaggcgg ttccggaggg 780
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 840
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcg cgtggagtgg 900
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccaogc ctcccgctgt ggactccgac 960
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1020
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1080
tcctgtctc cgggt 1095
    
```

<210> 2

<211> 657

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

35 <400> 2

ES 2 408 704 T3

```

gattttttga tgaoccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatcaagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
taoctgcaga aaccaggcca gtctecaaag ctctcatct acaaagtctc caacogattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctt 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaagcgta cggtagctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgcctctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa 480
togggtaact cccaggagag tgtca.cagag caggacagca aggacagcac ctacagctc 540
agcagcacc cagcctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccatc aggcctgag ctgcccctc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

```

<210> 3

<211> 365

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Val Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 260 265 270
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 275 280 285
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 290 295 300
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 305 310 315 320
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 325 330 335
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 340 345 350
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365

<210> 4
 <211> 219
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 42
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40

15 <210> 6
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
 1 5 10 15
 Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
 20 25 30
 His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
 35 40 45

```

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

```

5 <210> 7
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 7

```

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

```

15 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>

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

5 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 13

Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asn

10 <210> 14
 <2U> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 14

20 **Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr**
1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PUT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

30 <400> 15

Ile Gly Lys Thr Ile Ser Lys Lys Ala Lys
1 5 10

35 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 16

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
1 5 10 15

45 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

55 <400> 17

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
1 5 10

5 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 18

Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

15 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 19

25 **Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro**
1 5

30 <21Q> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 20

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1 5 10

40 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 21

Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
1 5 10 15
Pro Arg Cys Pro
20

50 <210> 22

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

5 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 22

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 1 5

10
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <400> 23

Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5

25 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 24

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 1 5

35 <210> 25
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 25

45 **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly**
 1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 20

50 <210> 26
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 26

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Gly Gly
 20 25 30
 Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40

5

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 27

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 20

20

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 28

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 20 25

30

<210> 29

<211> 27

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

40

<400> 29

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 20 25

45

<210> 30

<211> 25

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
20 25

10 <210> 31
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 31

20 **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala**
1 5 10 15
Pro Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
20 25

25 <210> 32
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

30 <400> 32

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
20 25

35 <210> 33
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 33

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Gly
1 5 10 15
Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
20 25

45 <210> 34
 <211> 29
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 34

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Sar Cys Pro Glu Pro Lys Ser
1 5 10 15
Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
20 25

10 <210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 35

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
1 5 10 15

20

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

30 <400> 36

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro

35 <210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Construcción sintética

<400> 37

Glu Ser Lys Tyr Gly
1 5

45

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 38

5

Pro Pro Cys Pro Ser
1 5

<210> 39

<211> 112

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 39

```

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

<210> 40

20

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<400> 40

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Val Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Ser Pro Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ser Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
    
```

30

<210> 41

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 41

```

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

10

<210> 42
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 108, 109, 112
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

25 <400> 42

```

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
          50          55          60
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Ser Pro Lys Ser Ser Ser Thr
          65          70          75          80
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
          85          90          95
Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Xaa Xaa Val Tyr Xaa
          100          105          110
Tyr Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
          115          120          125
Ser
    
```

30 <210> 43
 <211> 114

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 33, 100, 103
 10 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 43

```

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

15 <210> 44
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> 117
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 44

30
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15


```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30
Ala Ile Ser Trp Val Ala Arg Gly Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Gly Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala
      50      55      60
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
      65      70      75      80
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
      85      90      95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Cys Tyr
      100      105      110
Arg Gly Asp Tyr Xaa Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      115      120      125
Val Ser Ser
      130

```

<210> 45

<212> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 45

```

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

```

15 <210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 46

```

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

```

```

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Cys Ser Asn
          115          120

```

5 <210> 47
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 47

```

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

```

15 <210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 48

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

1 5 10 15

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

10 <400> 49

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

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

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

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

ES 2 408 704 T3

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Construcción sintética
<400> 50

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

15 <210> 51
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética
<400> 51

ES 2 408 704 T3

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 52

<211> 223

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 52

```

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

```

<210> 53

<211> 223

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 53

```

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

```

```

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105      110
Arg Thr Val Ala Leu Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
      115      120      125
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
      130      135      140
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Ala Ser Pro
      145      150      155
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
      165      170      175
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
      180      185      190
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
      195      200      205
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210      215      220

```

<210> 54

<211> 223

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 54

```

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

```

15 <210> 55

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

ES 2 408 704 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 55

5

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

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

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

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

ES 2 408 704 T3

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 56

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 56

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

ES 2 408 704 T3

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

ES 2 408 704 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 57

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 57

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

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

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

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

ES 2 408 704 T3

Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

ES 2 408 704 T3

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 58

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 58

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

- <210> 59
- <211> 373
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética
- 10 <400> 59


```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20
Trp Ile His Trp Val Ala Arg Gly Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35      40      45
Trp Met Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu
50      55      60
Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr
65      70      75      80
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr
85      90      95
Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly
100
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115      120      125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130      135      140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145      150      155      160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165      170      175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180      185      190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Ala Ser
195      200      205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Ala Ser Pro Lys Lys Val Glu
210      215      220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu Pro
225      230      235      240
Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Gly
245      250      255
Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
260      265      270
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
275      280      285
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
290      295      300
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
305      310      315      320
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
325      330      335
Val Ala Ser Pro Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
340      345      350
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
355      360      365
Ser Leu Ser Pro Gly
370

```

<210> 60
 <211> 365
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 60

ES 2 408 704 T3

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

ES 2 408 704 T3

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
260 265 270

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
275 280 285

ES 2 408 704 T3

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 290 295 300

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 305 310 315 320

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 325 330 335

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 340 345 350

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365

<210> 61
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 61

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

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

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

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro
 225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 260 265 270

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 275 280 285

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 290 295 300

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 305 310 315 320

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 325 330 335

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 340 345 350

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365

<210> 62
 <211> 365
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 62

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro
 225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 260 265 270

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 275 280 285

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 290 295 300

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 305 310 315 320

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 325 330 335

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 340 345 350

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365

<210> 63
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 63

```

Met Lys Leu Pro Val Ala Arg Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile
 1      5      10
Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
      20      25      30
Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
      35      40      45
Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln
      50      55      60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65      70      75
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
      100      105      110
Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr
      115      120      125
Lys Leu Glu Ile Lys
      130
    
```

- 5 <210> 64
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Construcción sintética

<400> 64

```

Met Lys Leu Pro Val Ala Arg Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile
 1      5      10
Pro Ala Ser Ser Ser Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
      20      25      30
Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
      35      40      45
Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln
      50      55      60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65      70      75
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
      100      105      110
Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr
      115      120      125
Lys Leu Glu Ile Lys
      130
    
```

- 15 <210> 65
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Construcción sintética

25 <400> 65


```

Met Lys Leu Pro Val Ala Arg Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile
 1      5      10
Pro Ala Ser Ser Ser Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
      20      25      30
Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
      35      40      45
Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln
 50      55      60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65      70      75
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85      90      95
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
      100      105      110
Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
      115      120      125

```

```

Lys Leu Glu Ile Lys
 130

```

5 <210> 66
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 66

```

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

```

15 <210> 67
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

25 <400> 67

ES 2 408 704 T3

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 68

<211> 138

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 68

ES 2 408 704 T3

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 69

<211> 138

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 69

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1 5 10 15

ES 2 408 704 T3

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Asn Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 70
 <211> 251
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 70

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

<210> 71

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 71

ES 2 408 704 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

ES 2 408 704 T3

210	215	220																		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu					
225					230					235					240					
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr					
				245					250					255						
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn					
			260					265					270							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe					
		275					280					285								
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn					
	290					295					300									
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr					
305					310					315					320					
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly												
				325																

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que comprende:

(a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos CDR y marco que se indican en una secuencia VL seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 47 y en la SEQ ID NO: 50; y

5 (b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos CDR y marco que se indican en una secuencia VH seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 51;

en donde la molécula de unión se une específicamente a un antígeno de Cripto humano.

2. La molécula de unión según la reivindicación 1, que comprende:

10 (a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 47; y

(b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 48.

3. La molécula de unión según la reivindicación 1, que comprende:

15 (a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 47; y

(b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 49.

4. La molécula de unión según la reivindicación 1, que comprende:

20 (a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 47; y

(b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 51.

5. La molécula de unión según la reivindicación 1, que comprende:

25 (a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 50, and

(b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 48.

6. La molécula de unión según la reivindicación 1, que comprende:

30 (a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 50; y

(b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 49.

7. La molécula de unión según la reivindicación 1, que comprende:

35 (a) una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 50, y

(b) una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 51.

40 8. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cadena pesada de la molécula de unión comprende un dominio CH3 genéticamente condensado a un dominio VH, VL o CH1 mediante un péptido conector sintético.

9. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la cadena pesada de la molécula de unión carece de todo o parte del dominio CH2.

10. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende una región constante derivada de un anticuerpo de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 5 11. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la molécula de unión comprende una secuencia de aminoácidos que es una región bisagra seleccionada del grupo que consiste en: una bisagra γ 1, una bisagra γ 2, una bisagra γ 3 y una bisagra γ 4.
12. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la molécula de unión comprende una bisagra quimérica.
- 10 13. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la molécula de unión comprende por lo menos una porción de un dominio bisagra IgG1, o por lo menos una porción de un dominio bisagra IgG3.
14. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la molécula de unión comprende una región constante de la cadena pesada que comprende un residuo cisteína en la posición 239 o 242, de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.
- 15 15. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la molécula de unión comprende una región constante de la cadena pesada que comprende por lo menos una modificación de aminoácidos según lo comparado con la región Fc de tipo natural.
16. La molécula de unión según la reivindicación 15, en la que la modificación comprende una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones 297-299, de modo tal que la variante está sustancialmente aglicosilada cuando se expresa en una célula mamífera.
- 20 17. La molécula de unión según la reivindicación 15 o 16, en la que la molécula de unión tiene una función efectora reducida en comparación con una molécula que tiene una región Fc de tipo natural correspondiente.
18. La molécula de unión según la reivindicación 17, en la que la molécula de unión posee citotoxicidad dependiente del antígeno en comparación con una molécula de unión que tiene una región Fc de tipo natural correspondiente.
- 25 19. La molécula de unión según la reivindicación 17 o 18, en la que la molécula de unión tiene mejor semivida en comparación con una molécula de unión que tiene una región Fc de tipo natural correspondiente.
20. La molécula de unión según cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en la que la región Fc modificada tiene por lo menos un residuo cisteína genéticamente modificado.
21. La molécula de unión según la reivindicación 20, en la que el residuo cisteína genéticamente modificado está en el dominio CH3 de la región Fc.
- 30 22. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que está conjugada a un resto efector.
23. La molécula de unión según la reivindicación 22, en la que el resto efector se selecciona del grupo que consiste en una citotoxina, un profármaco, una toxina biológica y un radioisótopo.
24. La molécula de unión según la reivindicación 22, en la que el resto efector se conjuga mediante un enlace amida.
25. La molécula de unión según la reivindicación 23, en la que el resto efector es un maitansinoide.
- 35 26. La molécula de unión según la reivindicación 1, en la que la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 53 y la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 56.
27. La molécula de unión según la reivindicación 1, en la que la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la SEQ ID NO: 53 y la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos marco y CDR que se indican en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 57.
- 40 28. La molécula de unión según la reivindicación 27, que comprende una región constante de la cadena pesada del isotipo γ 1.
29. La molécula de unión según la reivindicación 27, que comprende la secuencia de la región constante de la cadena pesada que se indica en la SEQ ID NO: 71.
- 45 30. La molécula de unión según la reivindicación 1, en la que la cadena ligera tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 53 y la cadena pesada tiene la secuencia expuesta como la SEQ ID NO: 58.

31. La molécula de unión según la reivindicación 1, en la que la cadena ligera tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 54 y la cadena pesada tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 56.
32. La molécula de unión según la reivindicación 1, en la que la cadena ligera tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 54 y la cadena pesada tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 57.
- 5 33. La molécula de unión según la reivindicación 1, en la que la cadena ligera tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 54 y la cadena pesada tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 58.
34. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-33 que es biespecífica.
35. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-33 que es tetravalente.
36. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-33 que es un anticuerpo de longitud total.
- 10 37. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-33 que es un fragmento de anticuerpo.
38. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-33 que es una proteína de fusión.
39. La molécula de unión según la reivindicación 27, que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se indica en la SEQ ID NO: 53 y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se indica en la SEQ ID NO: 57, en donde la molécula de unión está conjugada a un maitansinoide.
- 15 40. Una composición que comprende la molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-39 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
41. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada o ligera de una molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-29.
42. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 41 que está en un vector.
- 20 43. Una célula hospedante que comprende el vector según la reivindicación 42.
44. Un método para producir la molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-39, que comprende cultivar la célula hospedante según la reivindicación 43 bajo condiciones tales que se produzca la molécula de unión, y aislar la molécula de unión de la célula hospedante o el cultivo.
45. Una molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 23, 25 o 39 para tratar a un sujeto que se beneficiaría a partir del tratamiento con la molécula de unión.
- 25 46. La molécula de unión para uso según la reivindicación 45, en la que el sujeto padece cáncer.
47. La molécula de unión para uso según la reivindicación 45, en la que la molécula de unión se utiliza en combinación con un agente adicional.
48. La molécula de unión para uso según la reivindicación 47, en la que el agente adicional es un agente quimioterapéutico.
- 30 49. La molécula de unión para uso según la reivindicación 47, en la que el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en natalizumab, trastuzumab, bevacizumab, infliximab, rituximab, ibritumomab, tiuxetan, cetuximab, hidrocloreuro de levamisol, tositumomab, alemtuzumab, IMC-C225, mesilato de imatinib, fulvestrant, anastrozol, exemestano, letrozol, tamoxifeno, interferón alfa, denileucina diftotox, oblimersen, erlotinib HCl, bortezomib, talidomida y endostatina.
- 35 50. Una molécula de unión según la reivindicación 39, para uso en el tratamiento de un tumor que sobreexpresa Cripto.
51. La molécula de unión según la reivindicación 50, en la que la molécula de unión es para usar en una dosis de por lo menos aproximadamente 5 mg/kg.
- 40 52. La molécula de unión para uso según la reivindicación 50, en la que la molécula de unión es para usar en una dosis de por lo menos aproximadamente 10 mg/kg.
53. La molécula de unión para uso según la reivindicación 50, en la que la molécula de unión es para usar por vía intraperitoneal, oral, intranasal, subcutánea, intramuscular, tópica o intravenosa.

54. La molécula de unión para uso según la reivindicación 50, en la que el paciente padece cáncer en un órgano seleccionado del grupo que consiste en cerebro, mama, testículo, colon, pulmón, ovario, vejiga, útero, cuello uterino, páncreas y estómago.

5 55. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha secuencia VL comprende además una secuencia de señalización.

56. La molécula de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha secuencia VH comprende además una secuencia de señalización.

10 57. La molécula de unión según la reivindicación 55 o 56, en la que dicha secuencia VL comprende las SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65, y en donde dicha secuencia VH comprende las SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69.

FIGURA 1A

Secuencia de ácido nucleico de chB3F6 que carece del dominio CH2 de cadena pesada que contiene el péptido conector G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser]

CAGGTCCAACCTGCAGCAGGTTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGA
 AGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATACACTGGGT
 GAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGAATGATCCTAGCAAC
 GGTTCGTAATACTACAATGAGAAGTTCAGAACAAGGCCACACTGACTGTAGACA
 AATCCTCCAGCACAGCCTACATGCATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGC
 GGTCTATTACTGTTCAAGGGGCCCTAATTACTTCTATTCTTGGACTACTGGGGTC
 AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC
 CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGA
 CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCT
 CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
 CTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACAC
 ACCTCCCCATGCCACGGTGCCAGCACCTGGAGGTGGCTCGAGTGGAGGCGGT
 TCCGGAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATG
 AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG
 CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACC
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCG
 TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEC ID NÚM: 1

FIGURA 1B

Secuencia de ácido nucleico de chB3F6 que carece del dominio CH2 de cadena ligera

GATTTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGATCAAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTA
TTTCGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTCATCTACAAA
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGA
CAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTA
CTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCTCACGTTCCGGTCTGGGACAAGCTGGAGC
TGAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA
GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA
GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTT
GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC
CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEC ID NÚM: 2

FIGURA 2A

Secuencia de ácido nucleico de chB3F6 que carece del dominio
CH2 de cadena pesada que contiene el péptido conector
G1/G3/Pro243Ala244Pro245 + [Gly/Ser]

QVQLQQVGAELVKPGASVKLSCKASGYTFSTYWIHWVKQRPGQGLEWIGENDPSN
GRTNYNEKEFKNKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCSRGPNYFY SMDYWG
QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPPEPKSCDTPPPCPRCPAPGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEC ID NÚM: 3

FIGURA 2B

Secuencia de aminoácidos de chB3F6 que carece del dominio CH2
de cadena ligera

DFLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFGVPPDRFSGSGGTDFTLKISRVEADLGVYYCFQGSHPVPLTFGAGTKLE
LKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID NÚM: 4

FIGURA 3

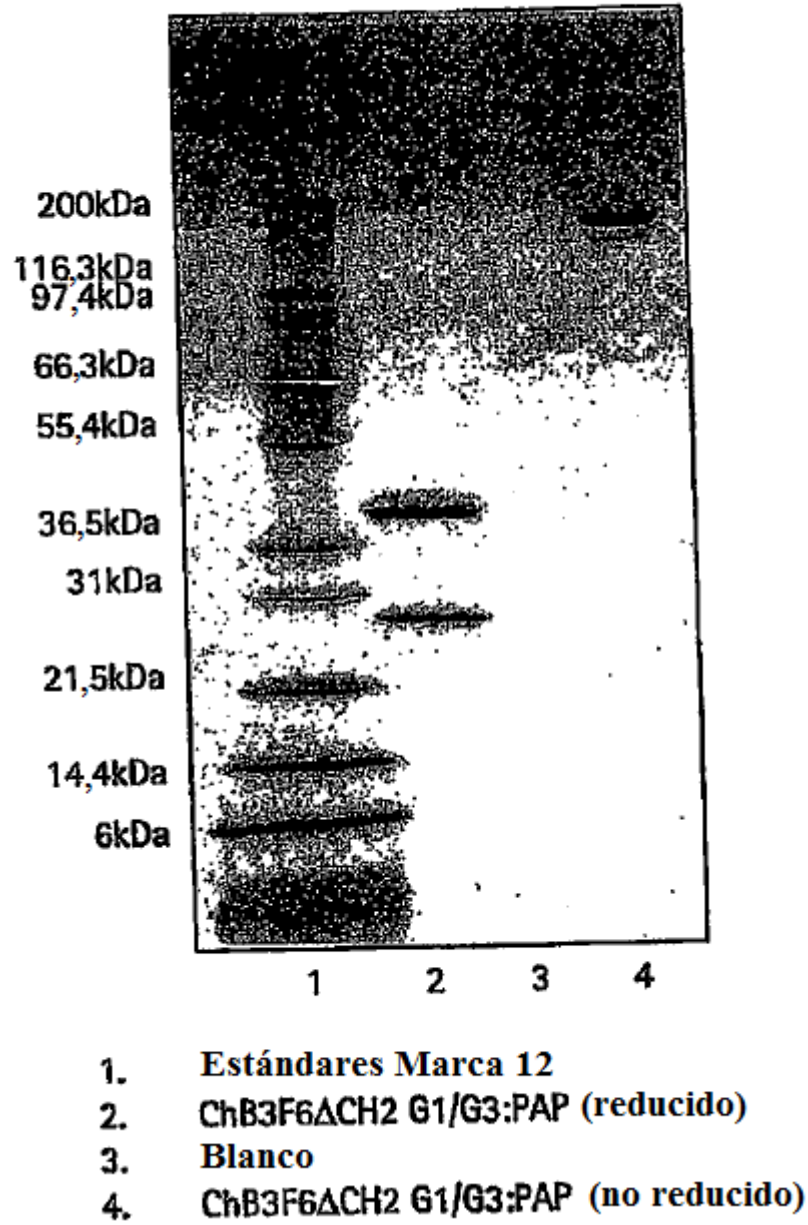


FIGURA 4

FACS de competición en células CEO

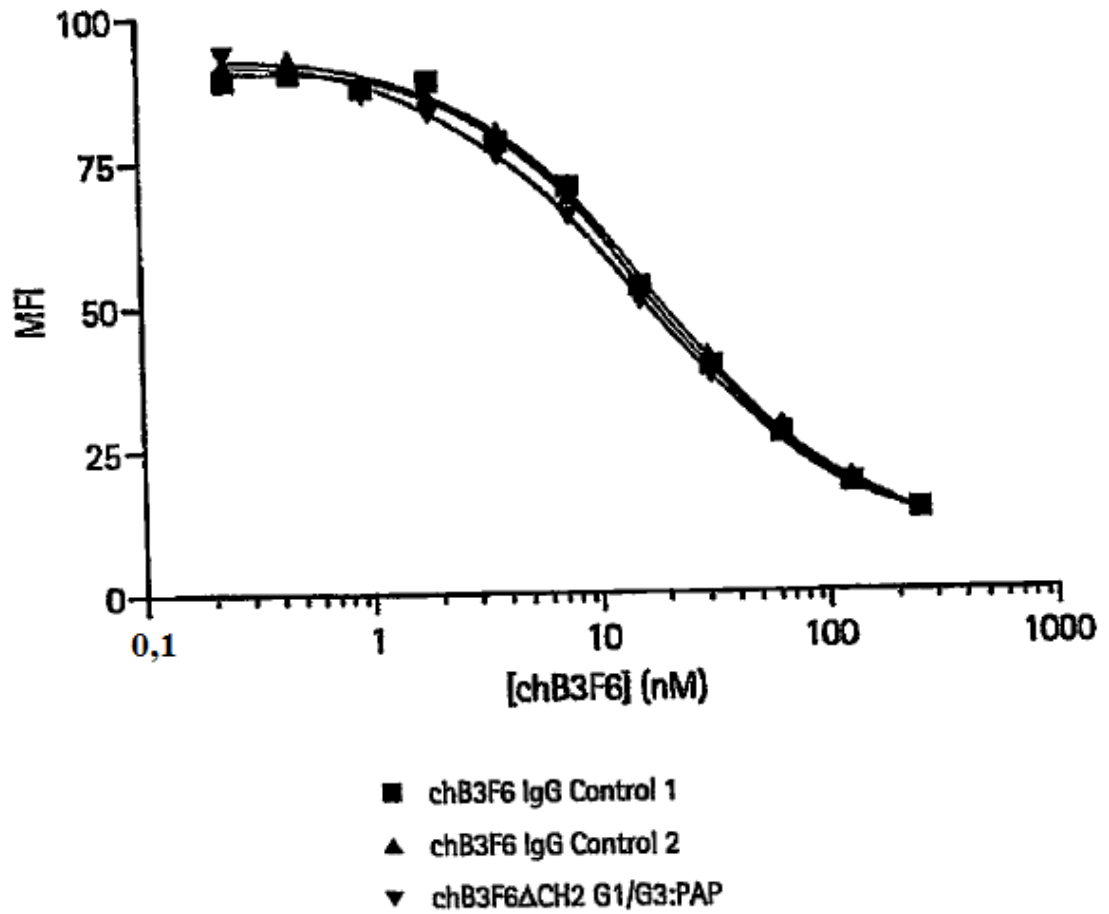


FIGURA 5

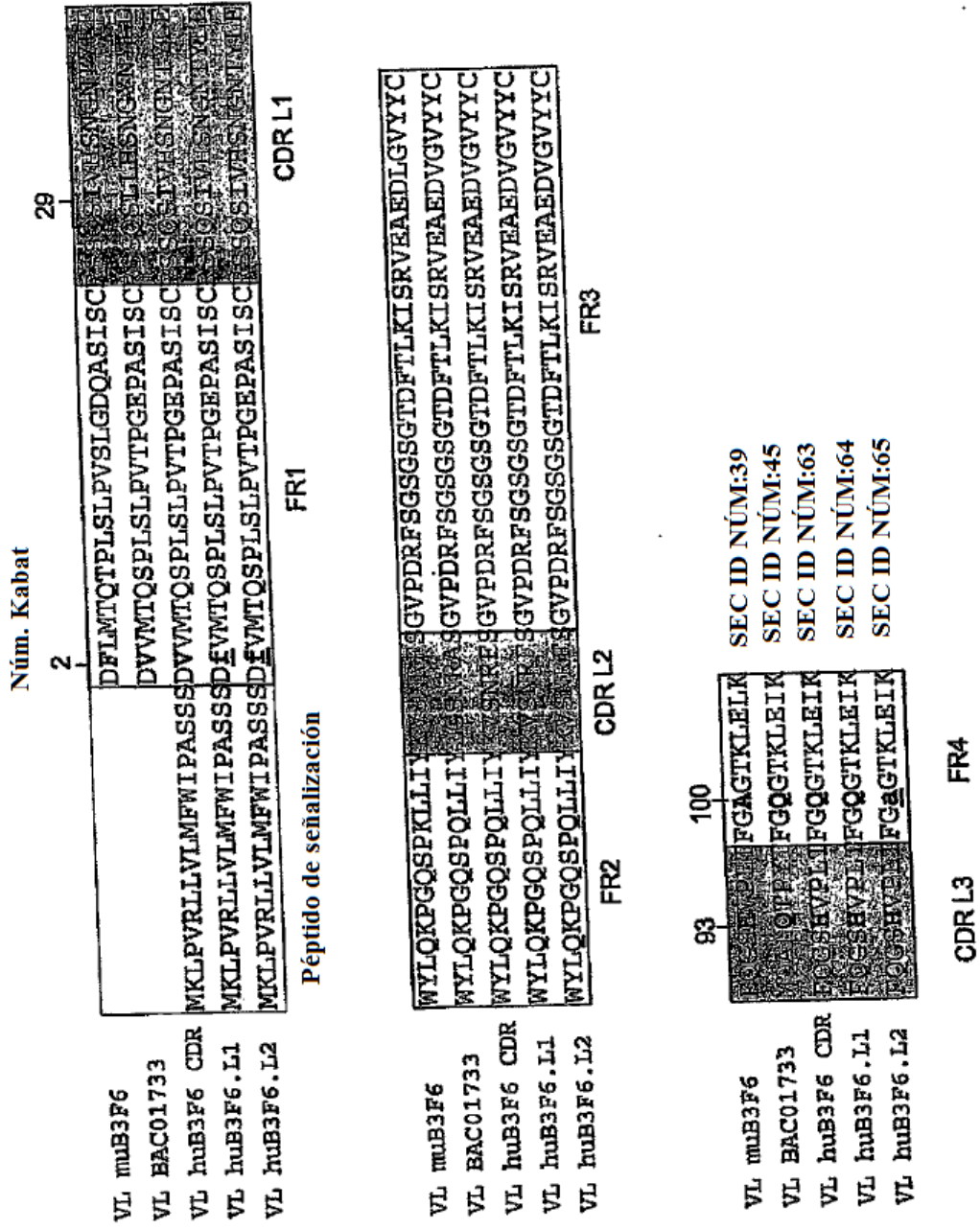


FIGURA 6

Núm. Kabat

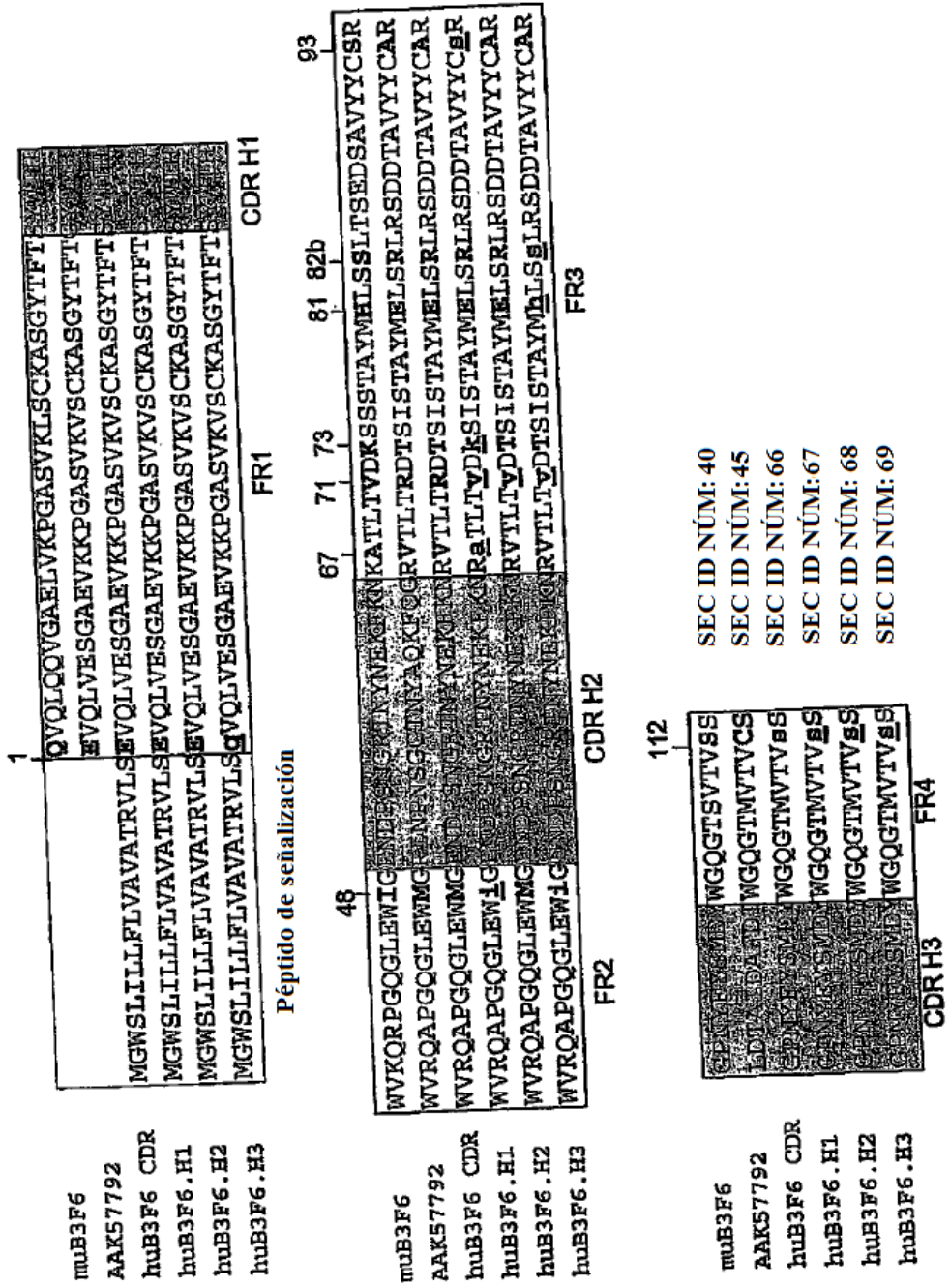


FIGURA 7

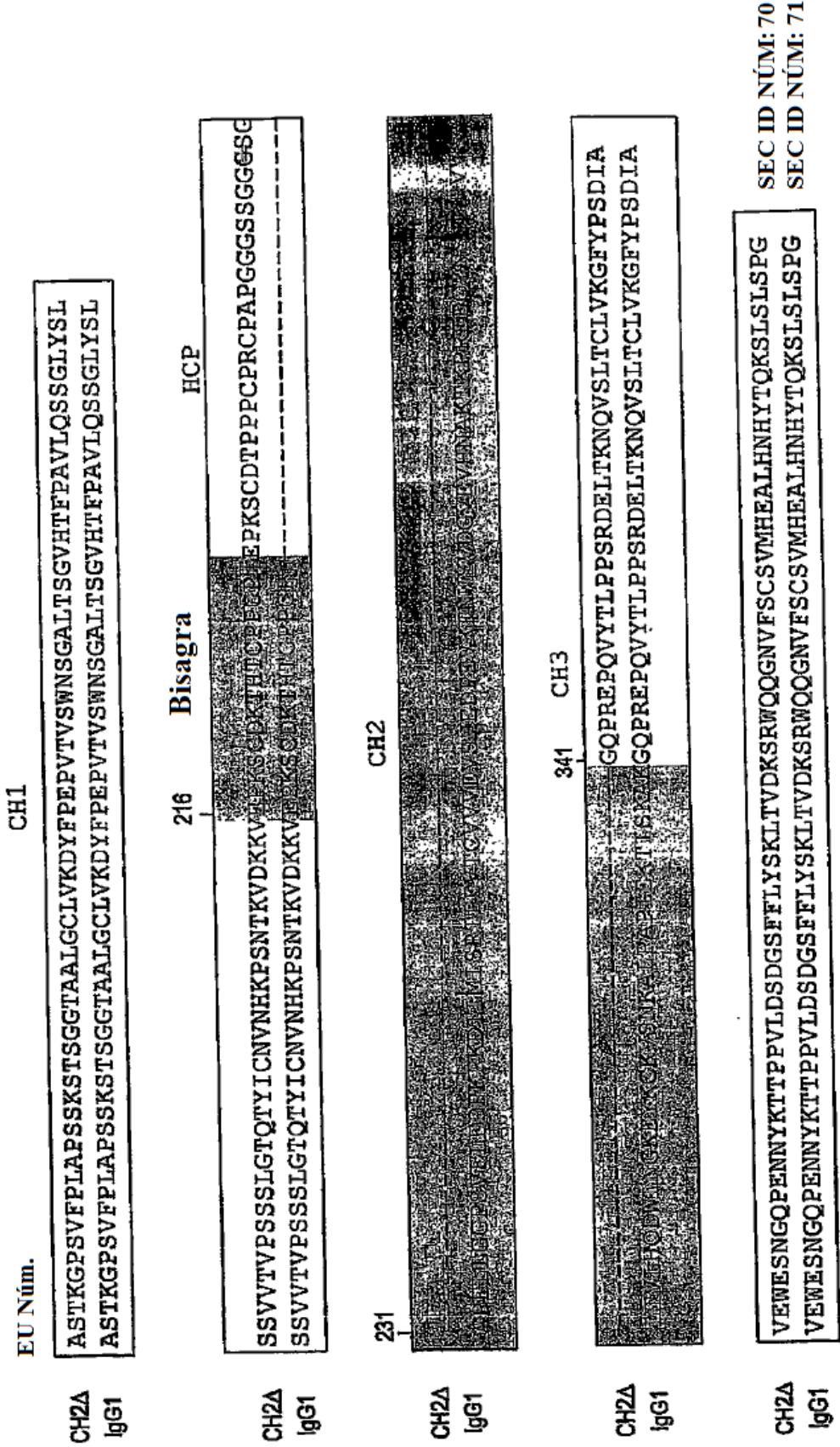


FIGURA 8

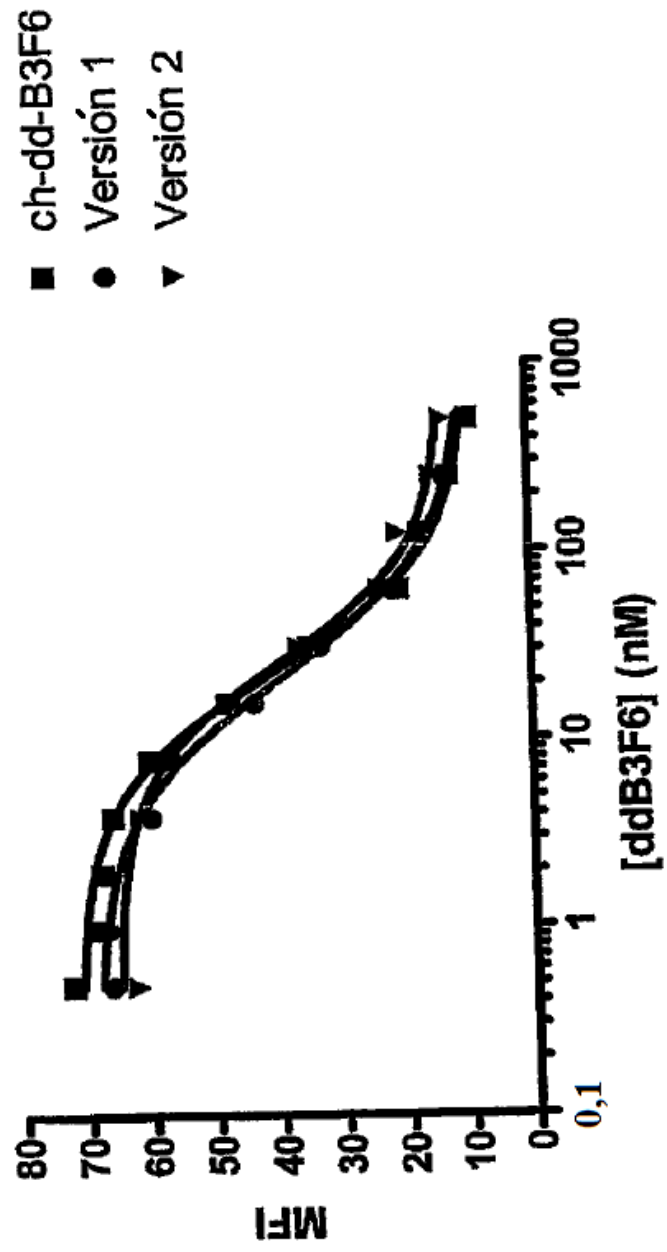


FIGURA 9

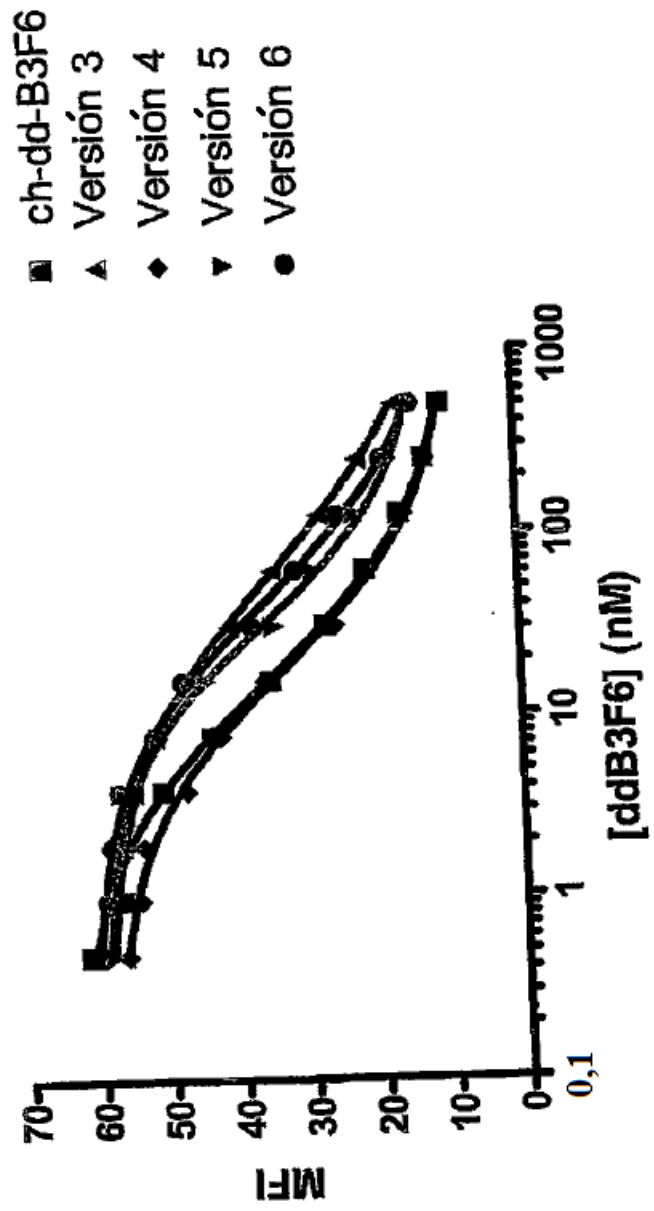


FIGURA 10

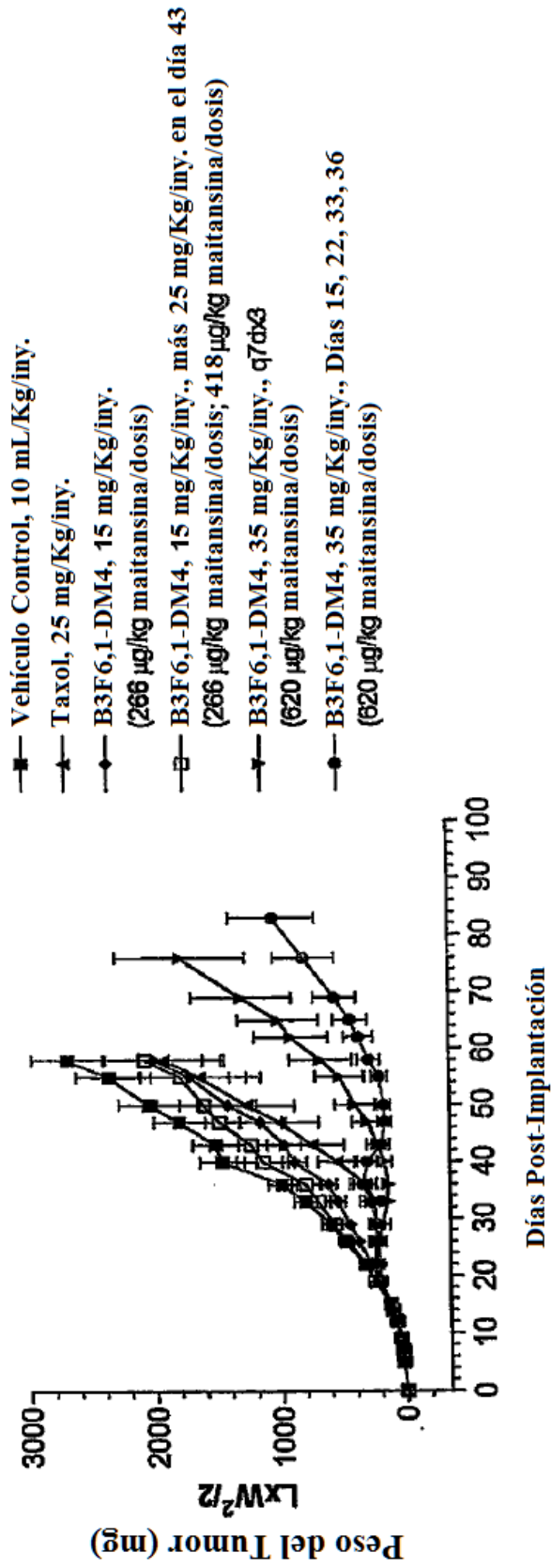


FIGURA 11A

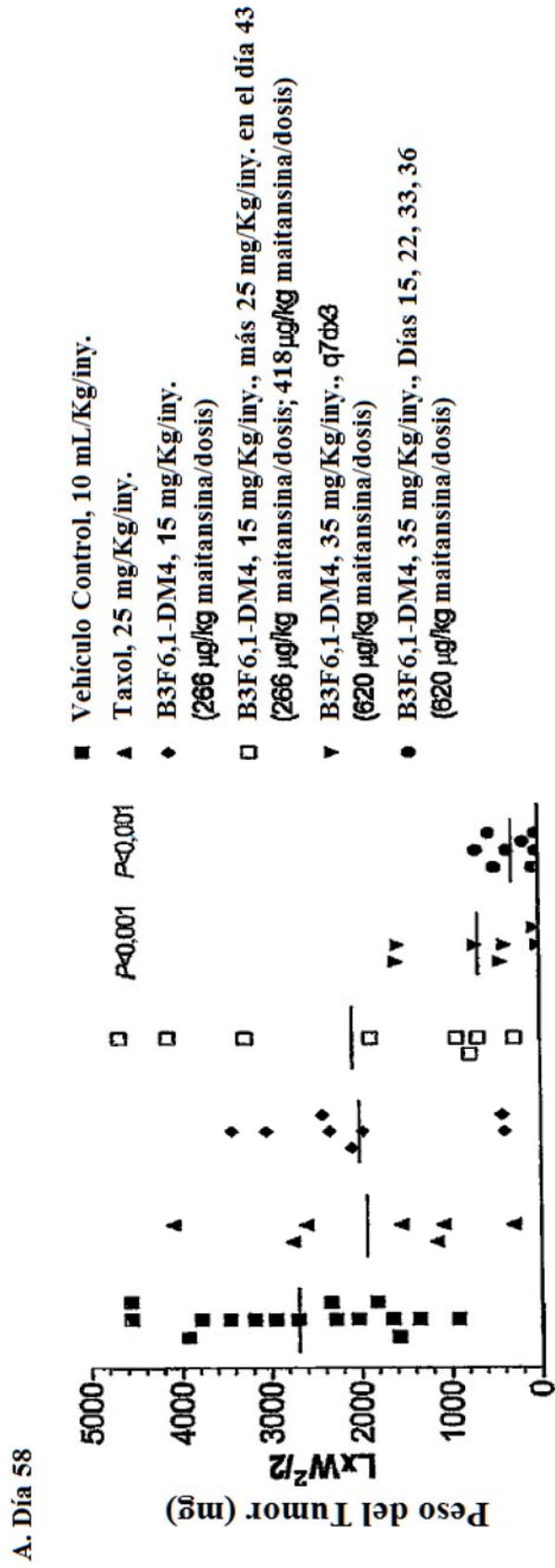


FIGURA 11B

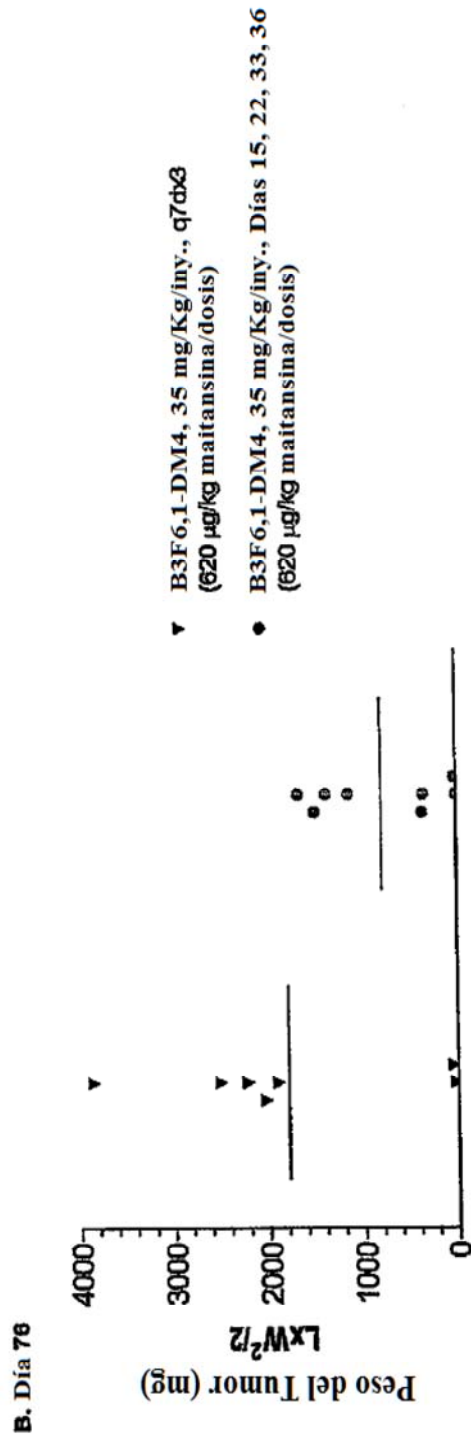


FIGURA 12

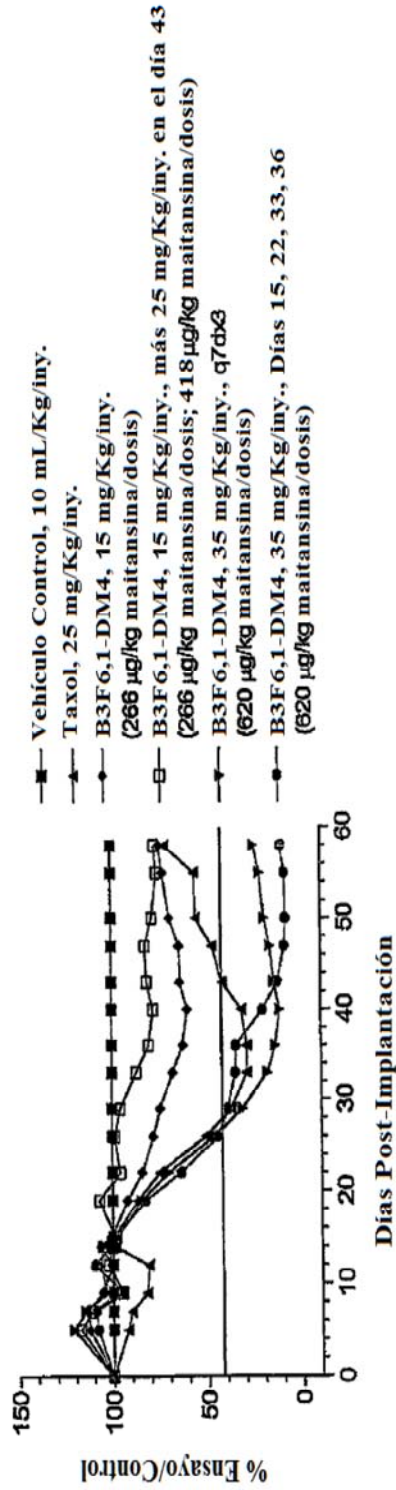


FIGURA 13

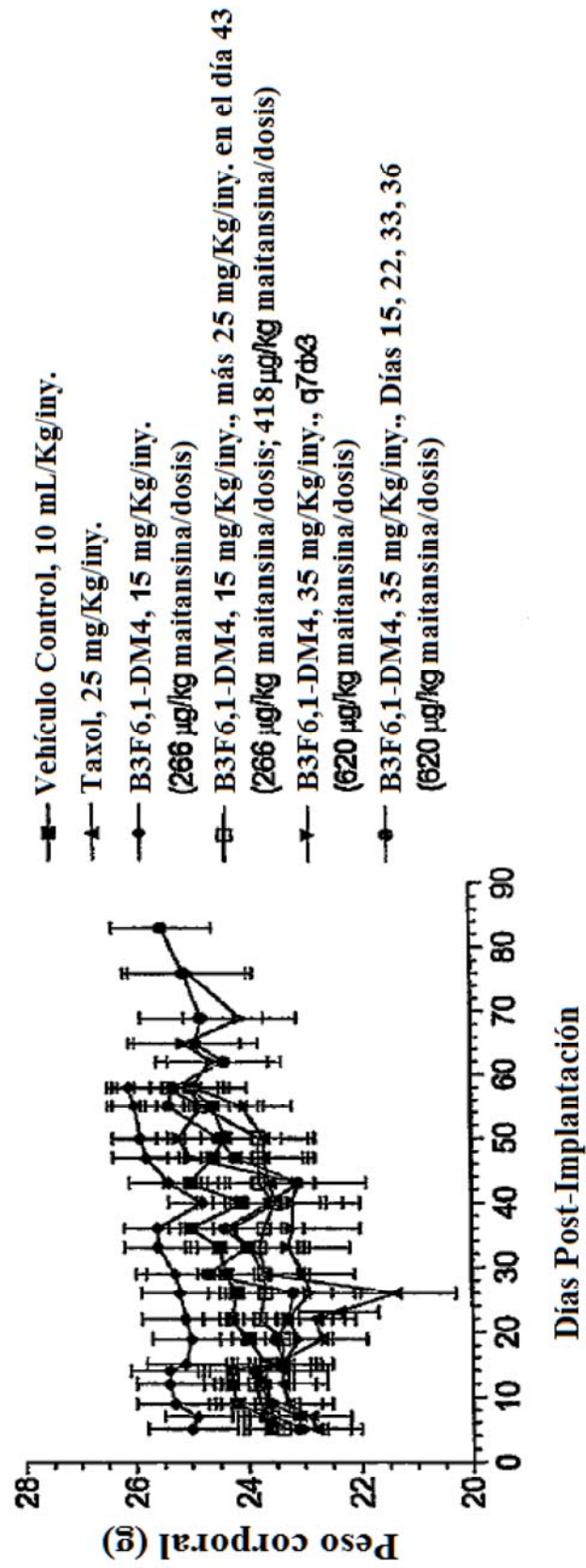


FIGURA 14

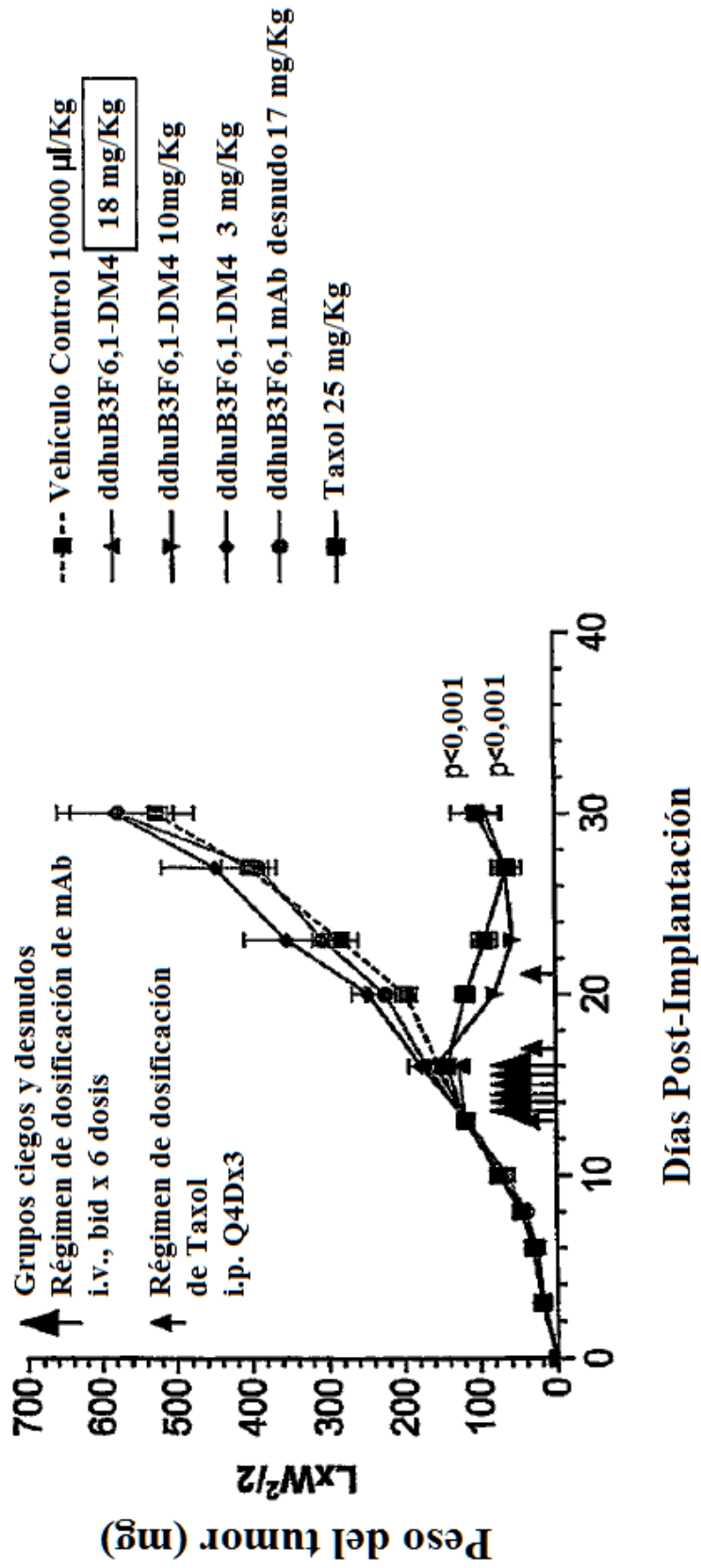


FIGURA 15

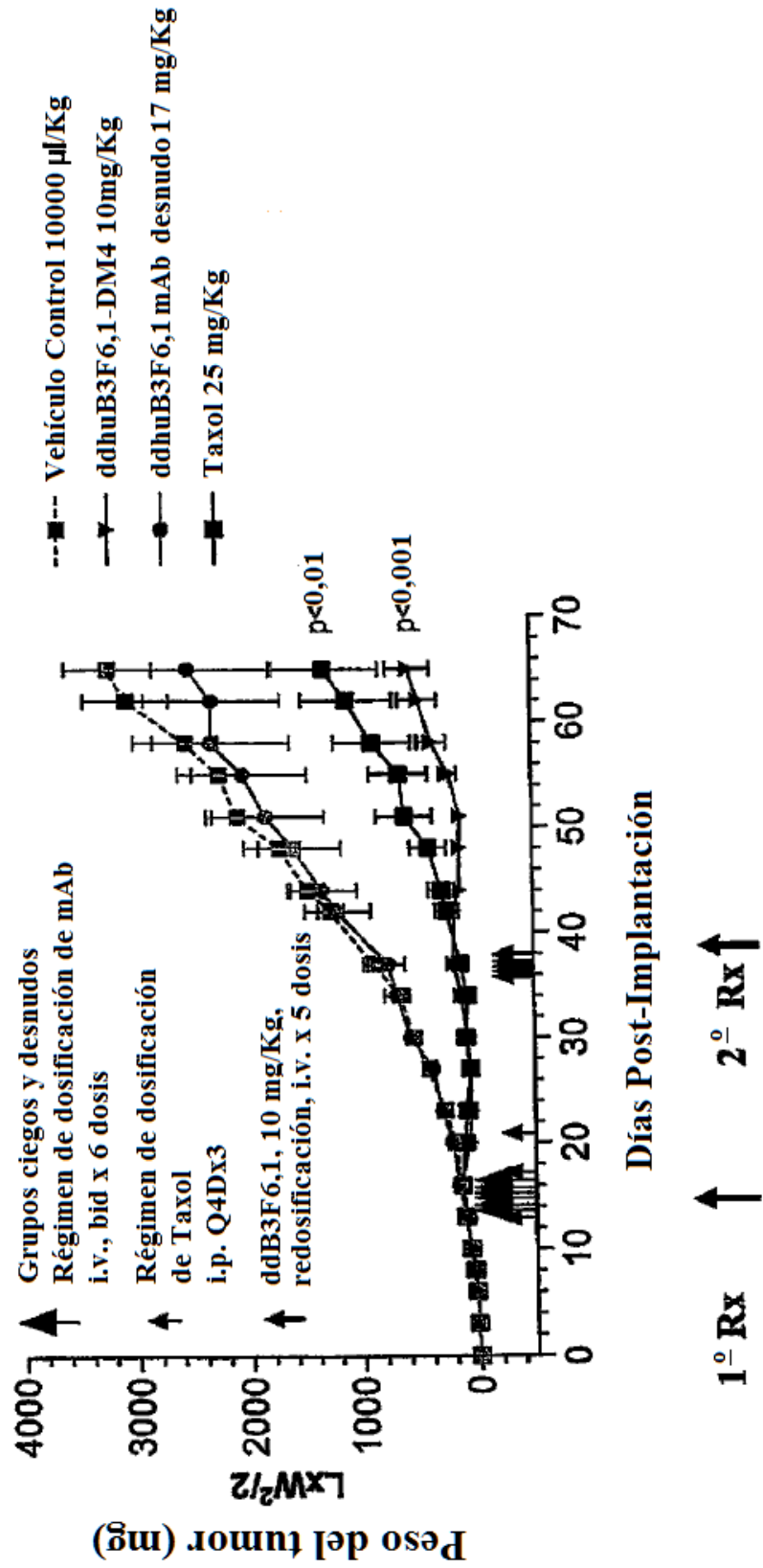


FIGURA 16

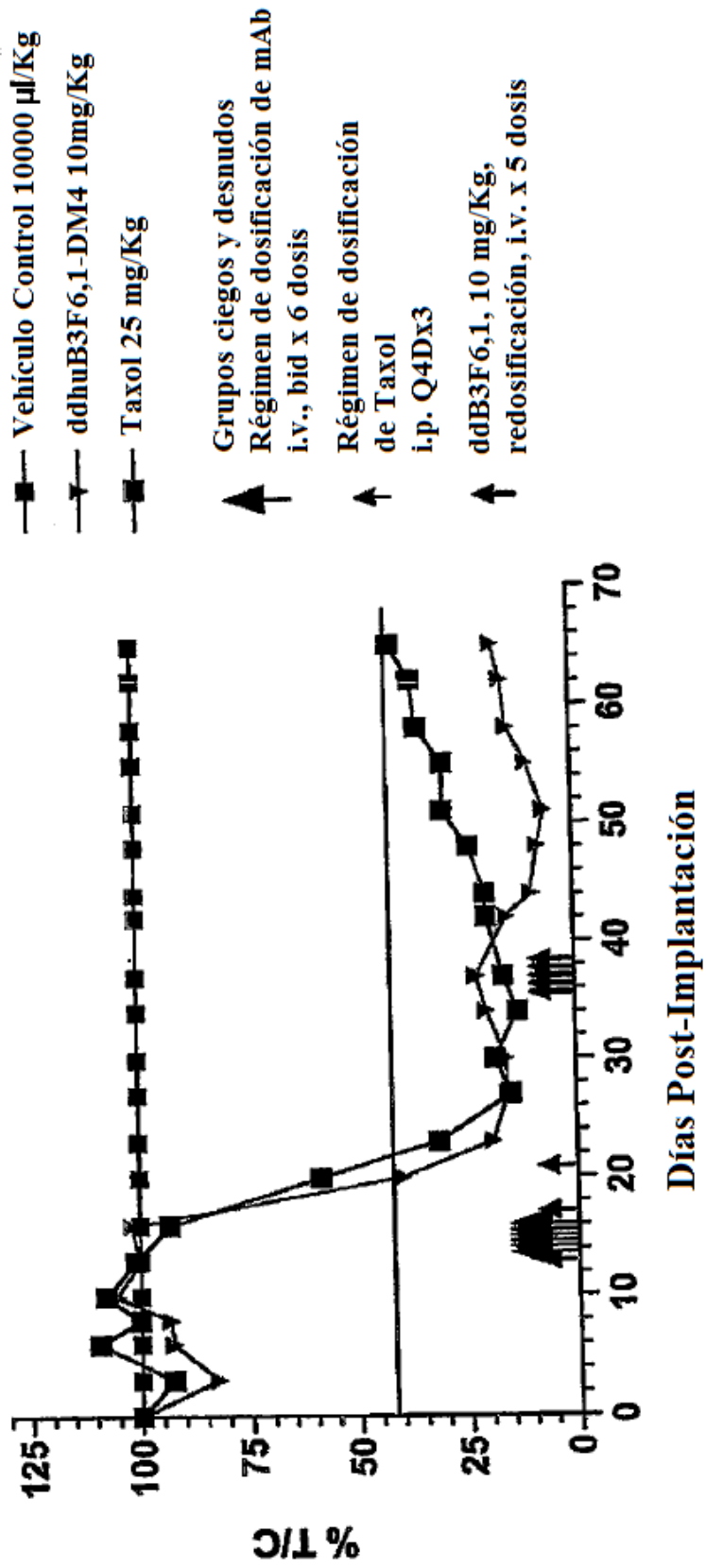


FIGURA 17

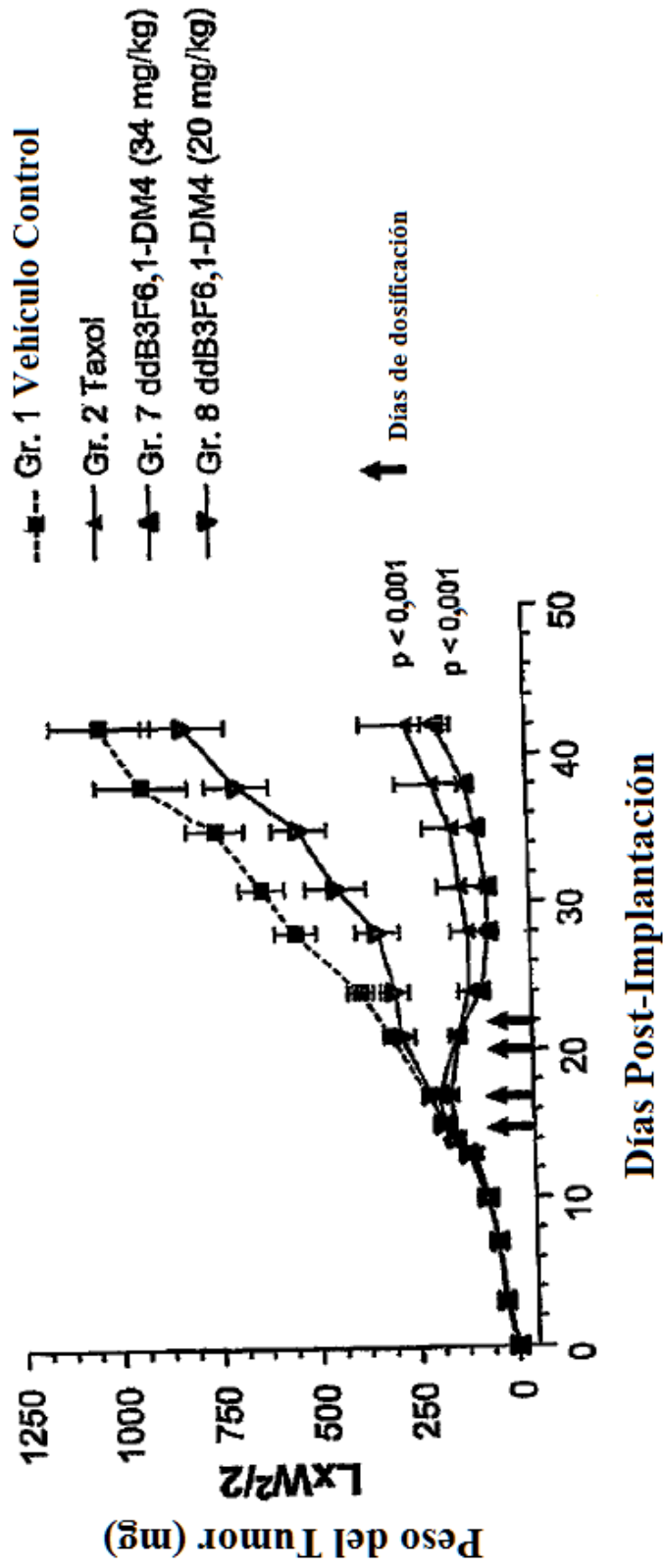


FIGURA 18

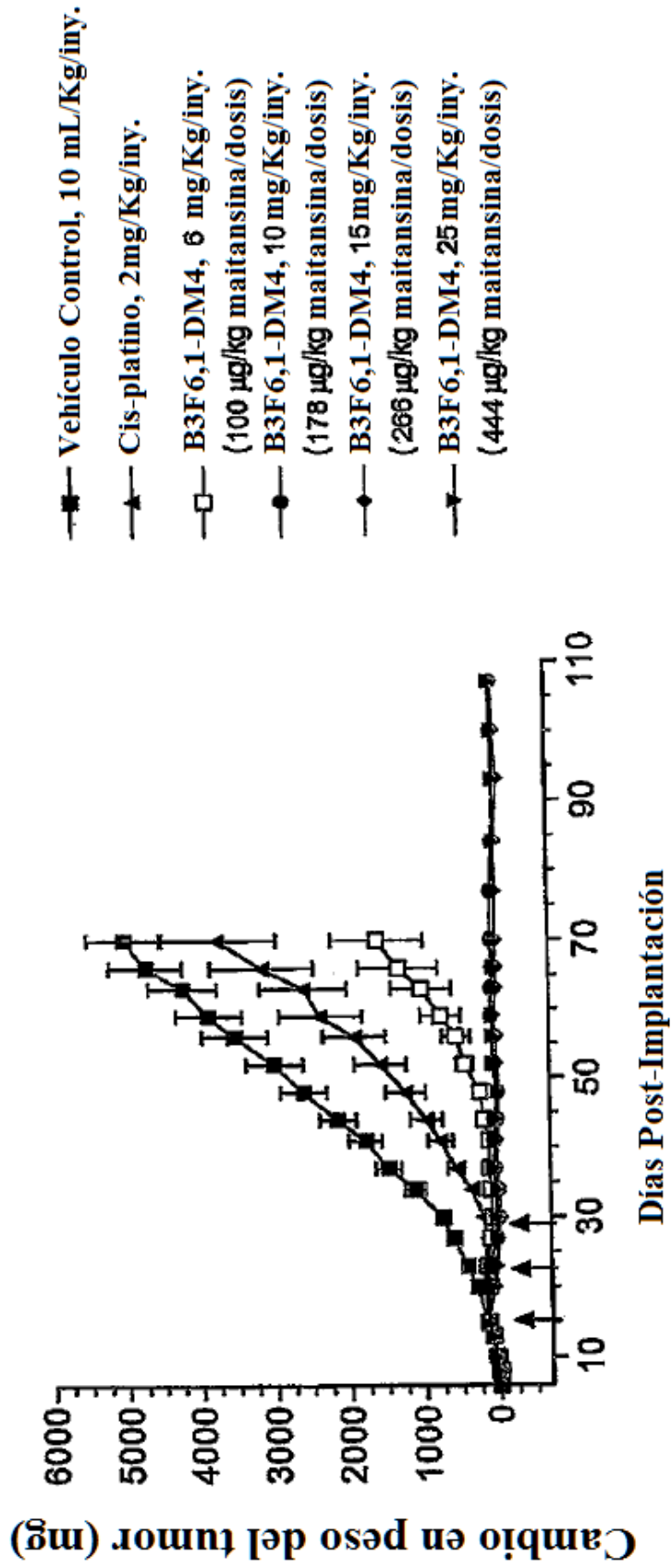


FIGURA 19A

A. Día 70

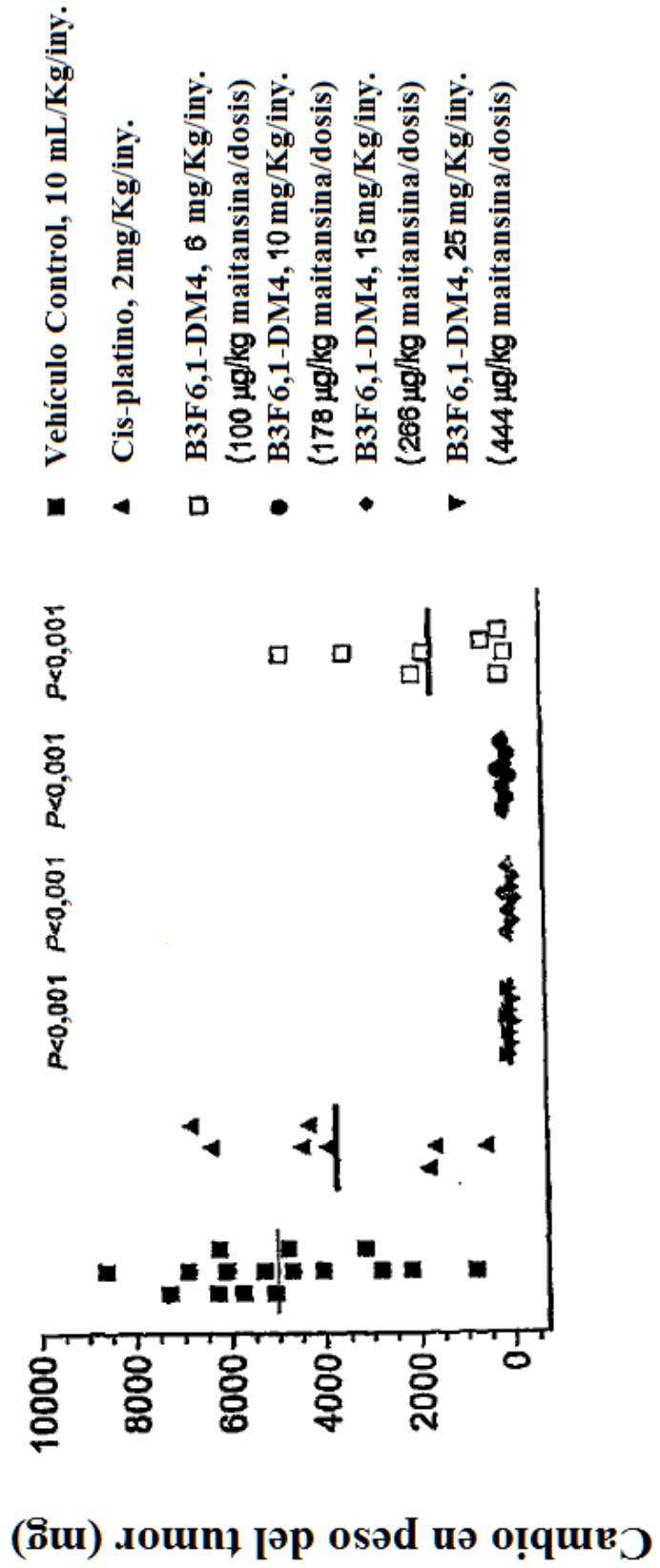


FIGURA 19B

B. Día 107

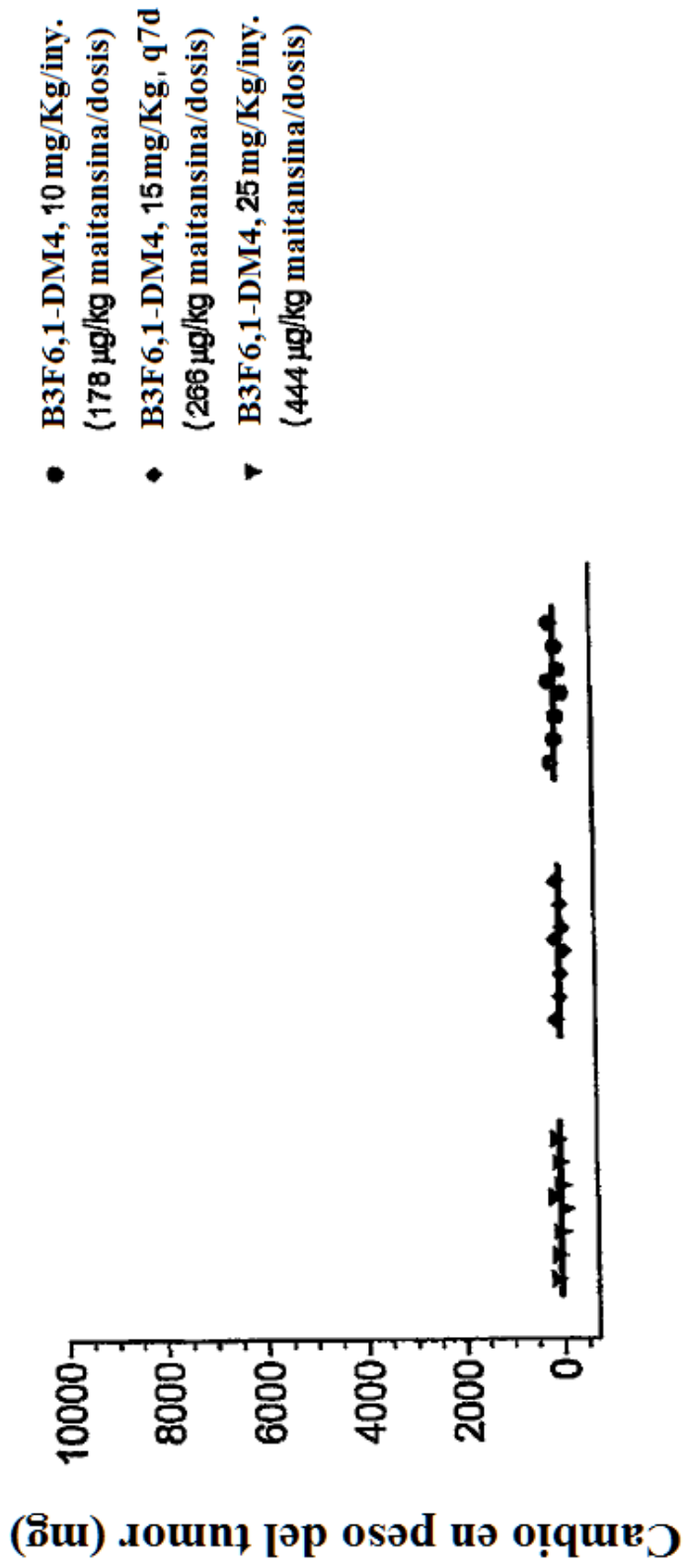


FIGURA 20

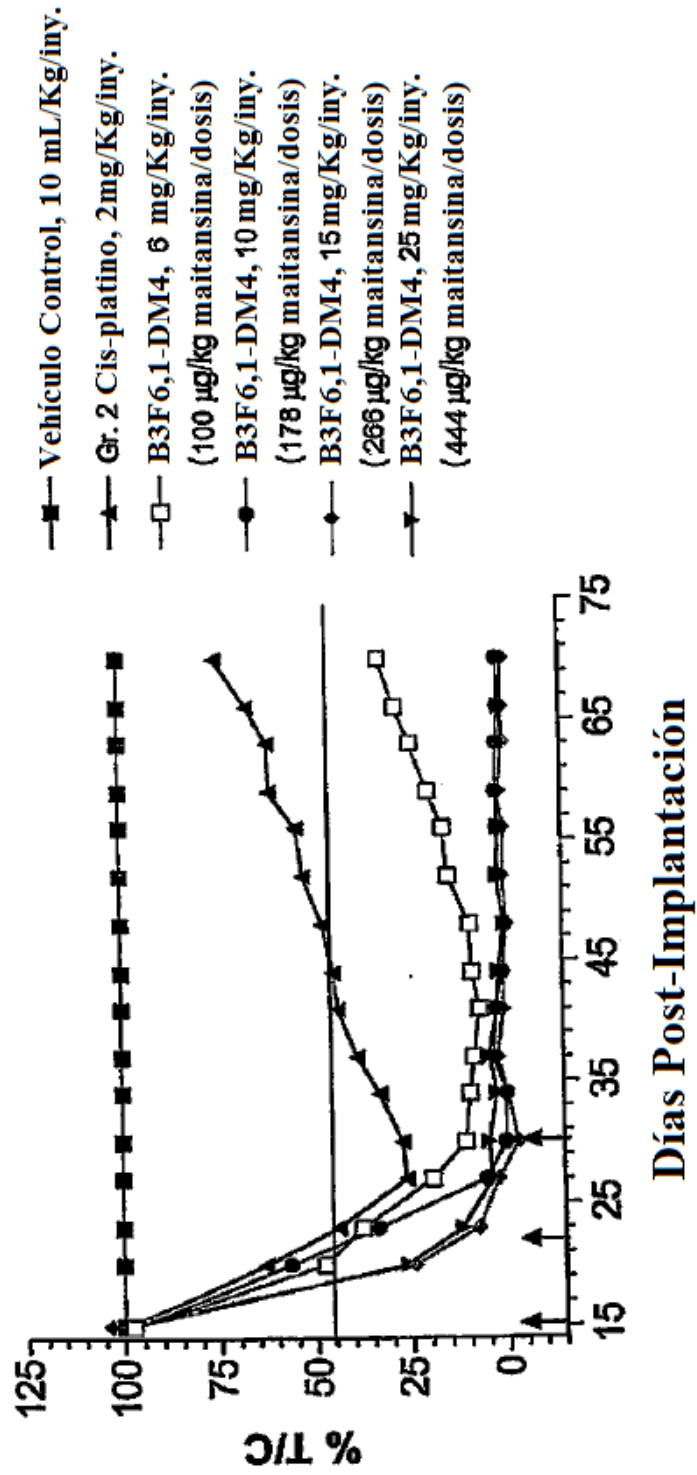


FIGURA 21

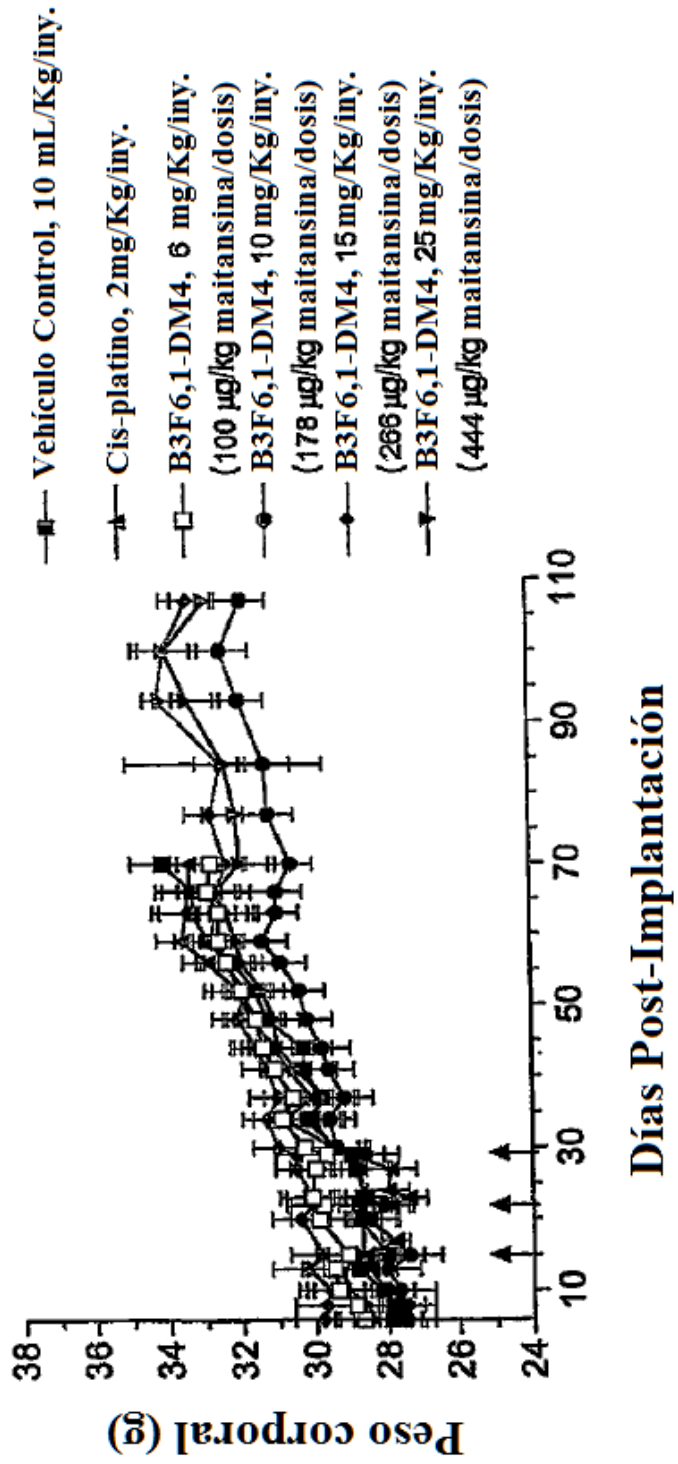


FIGURA 22A

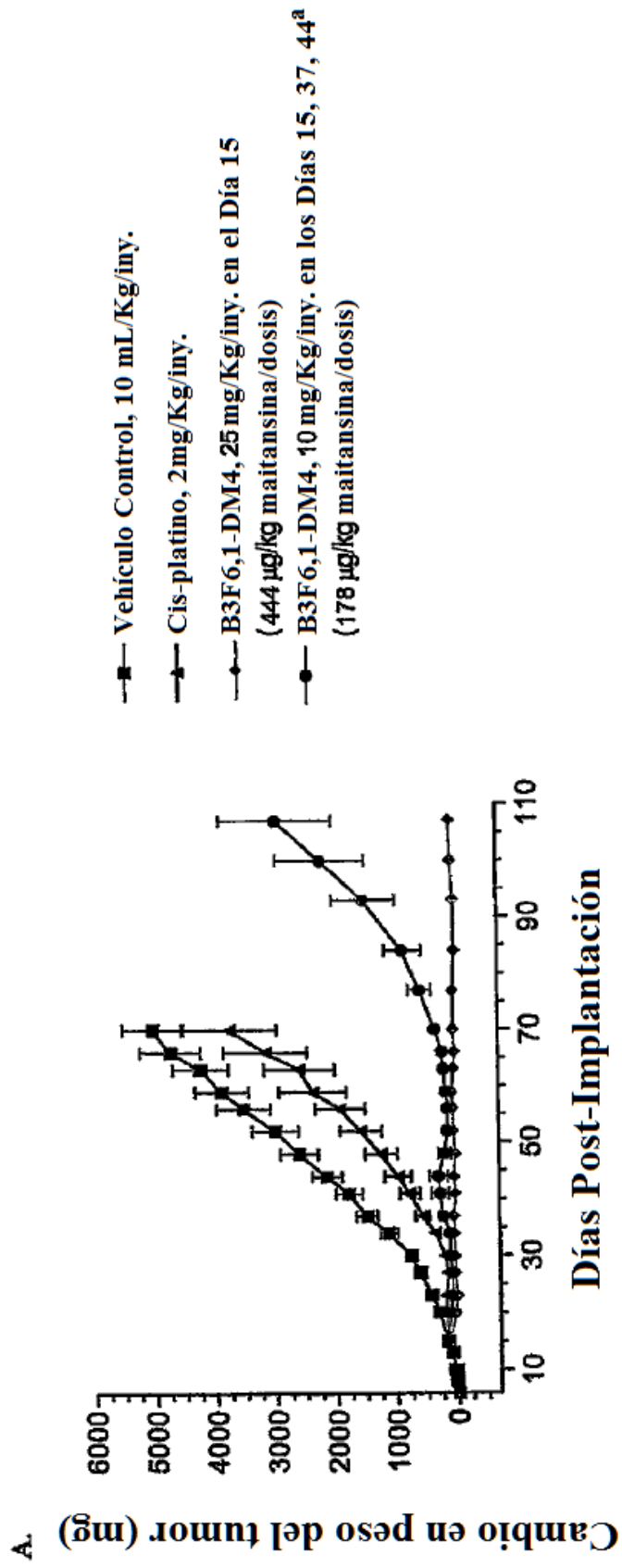


FIGURA 22B

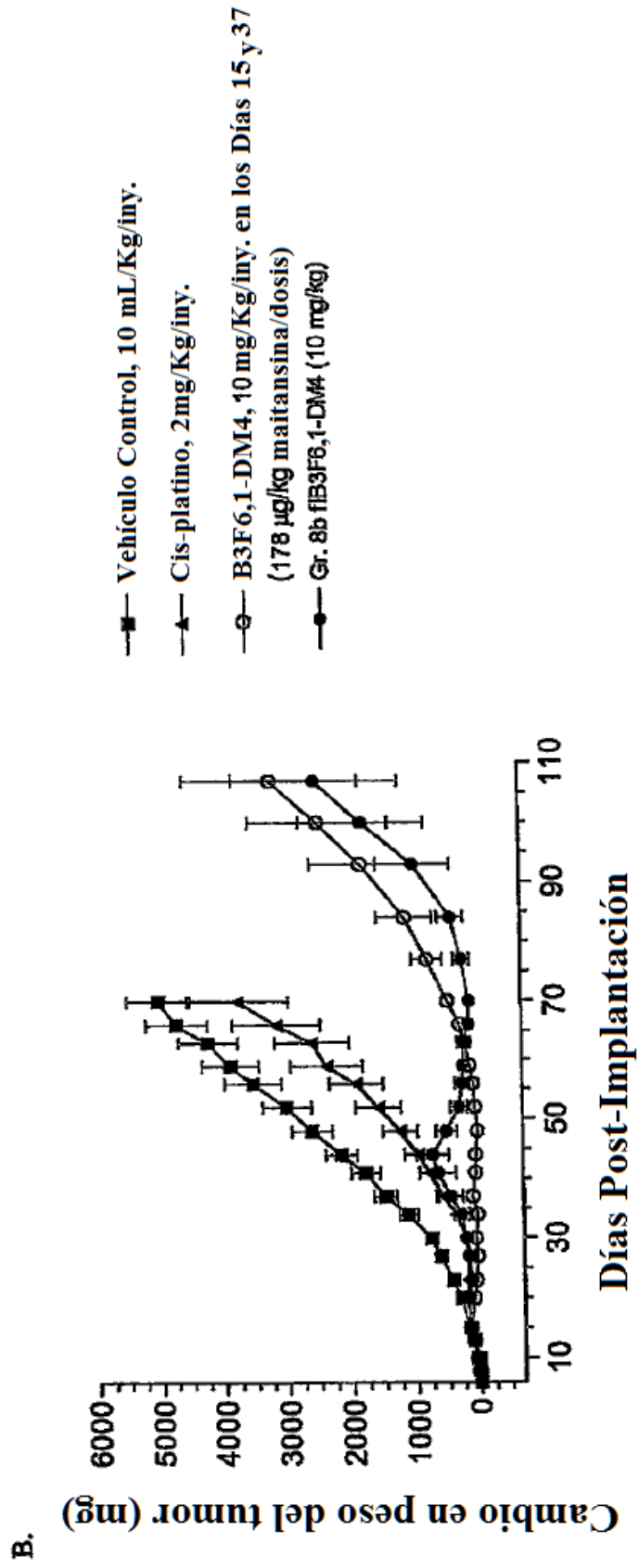


FIGURA 23A

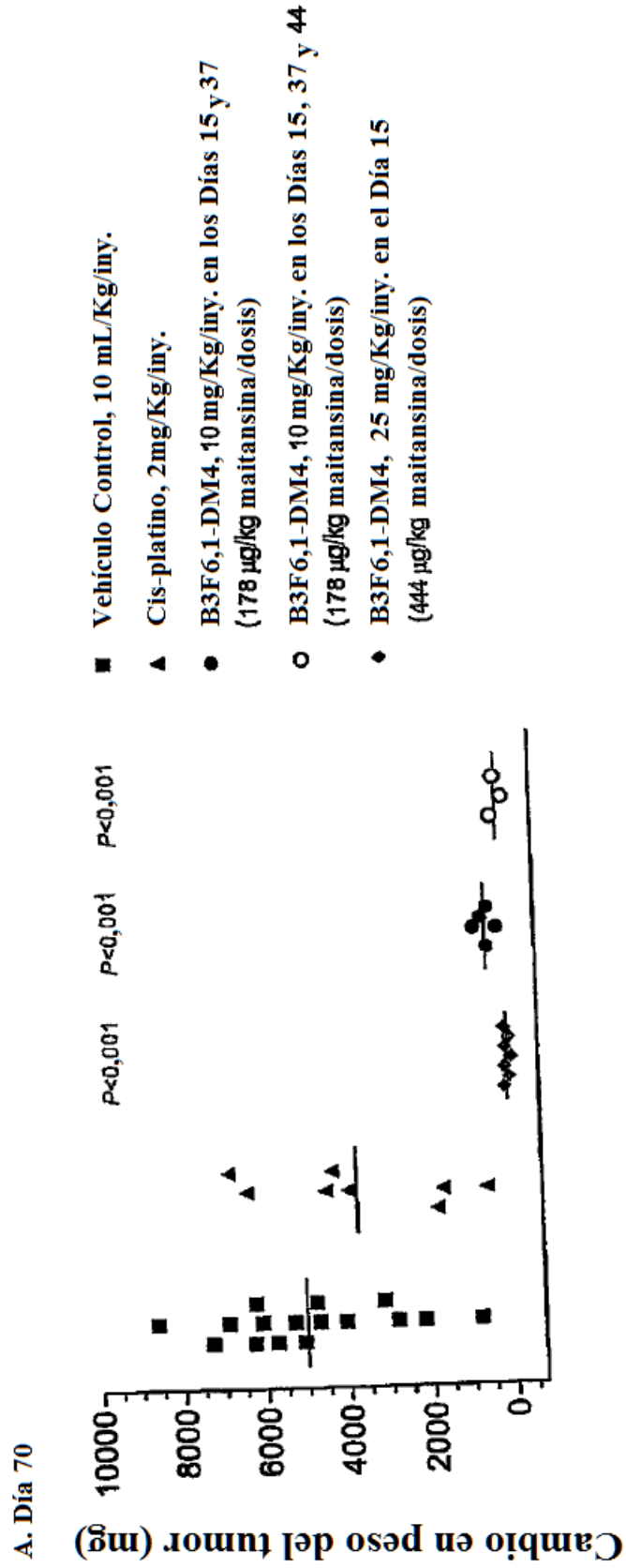


FIGURA 23B

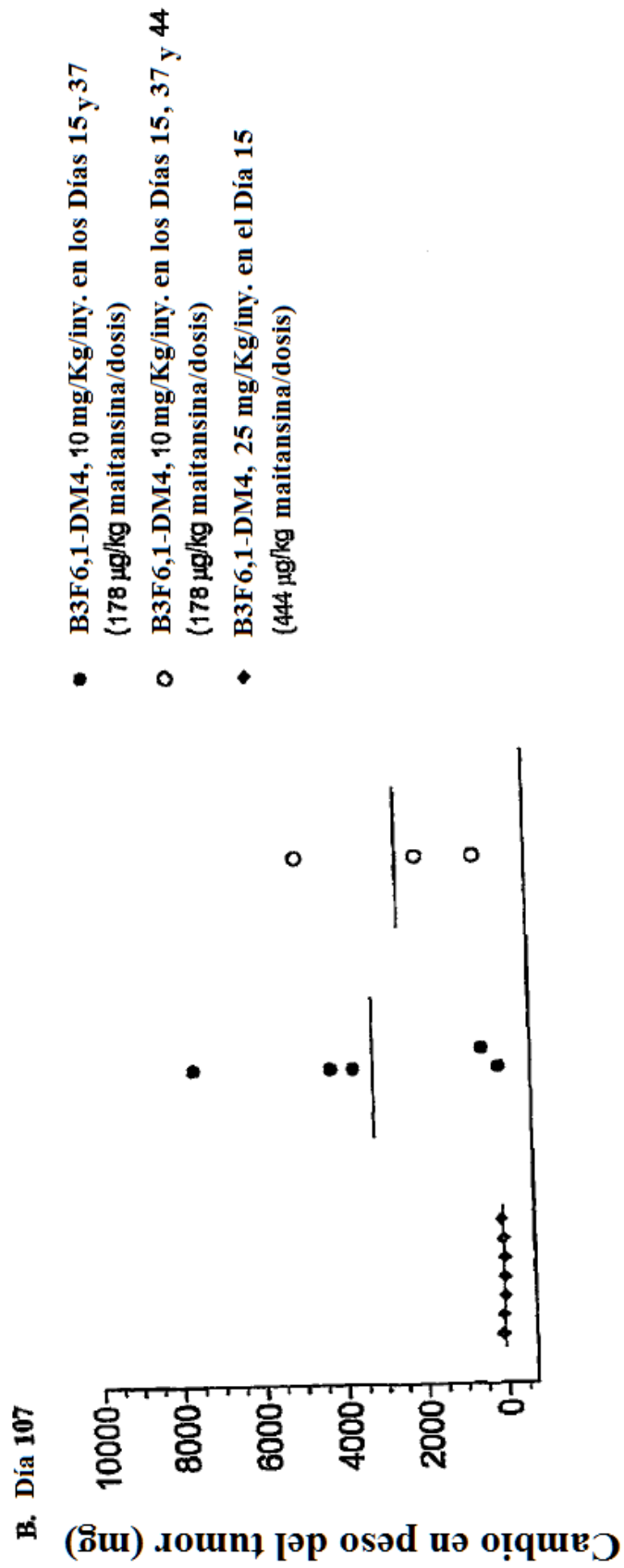


FIGURA 24A

A.

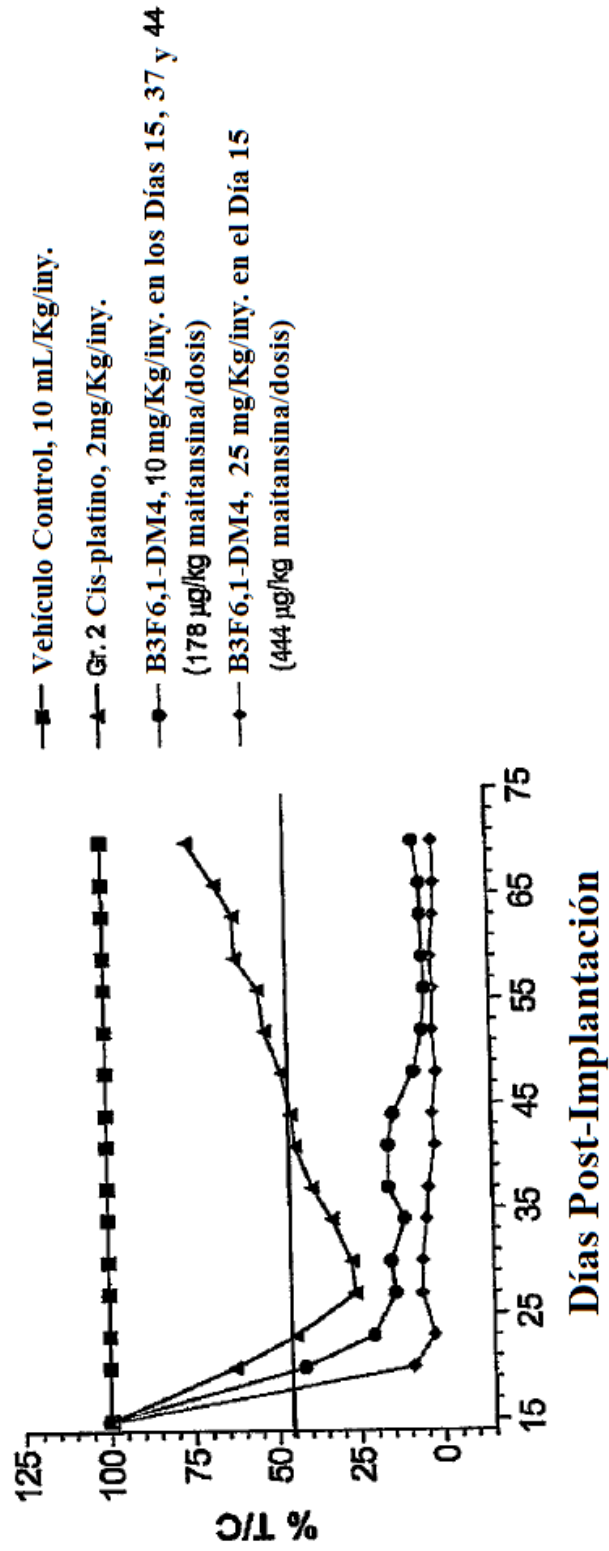


FIGURA 24B

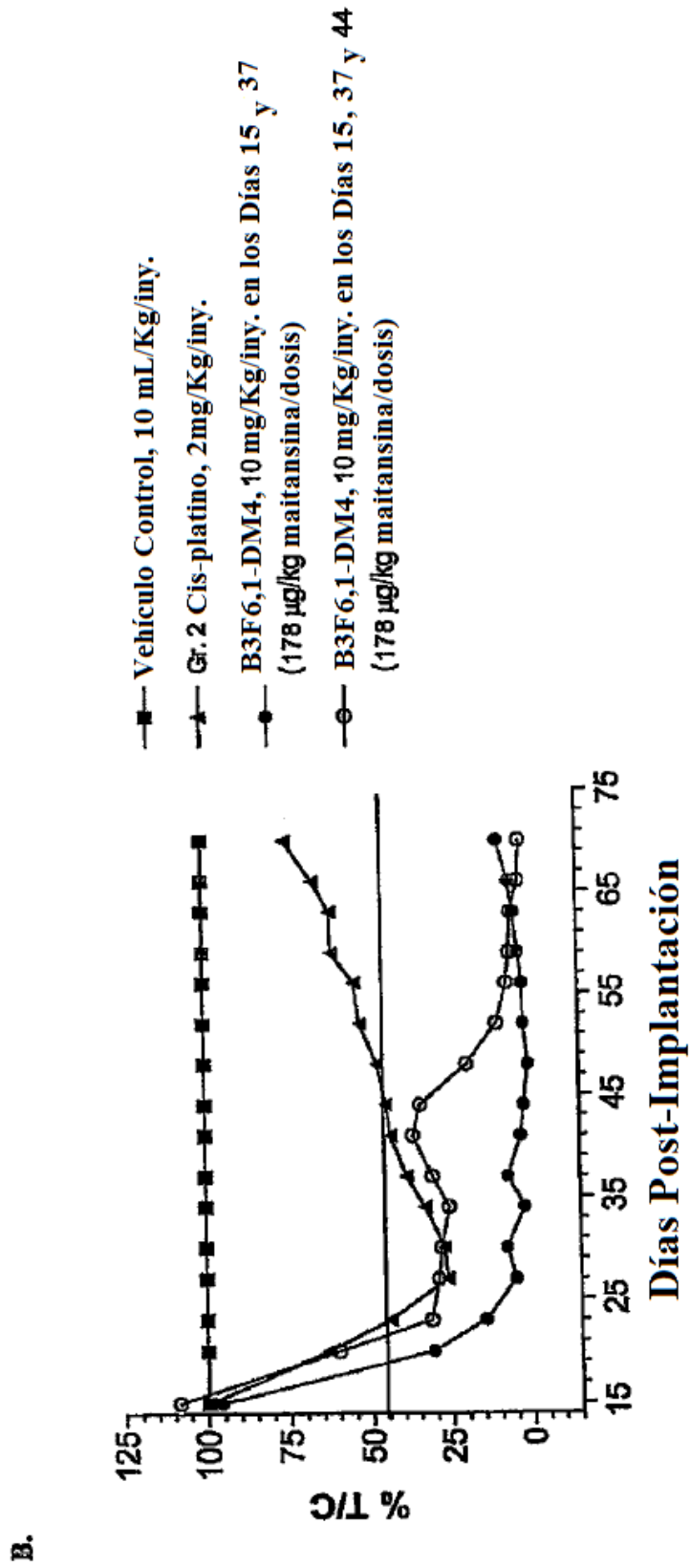


FIGURA 25A

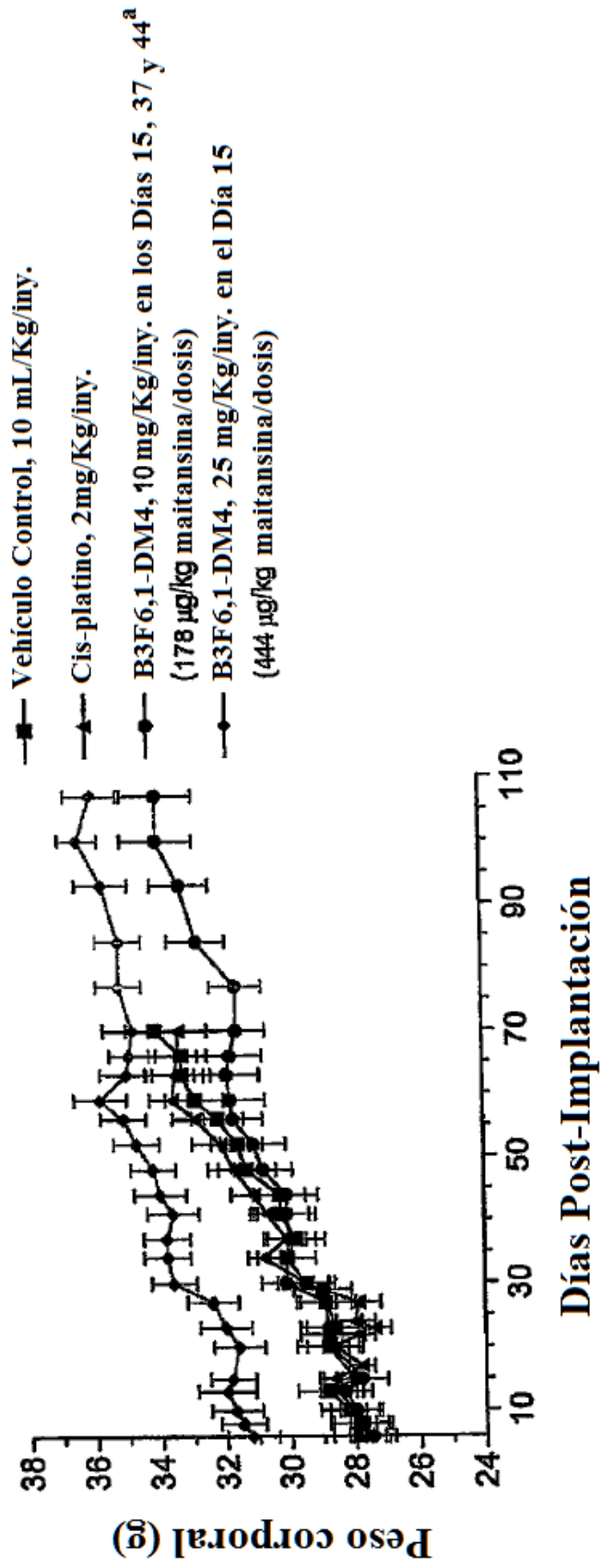


FIGURA 25B

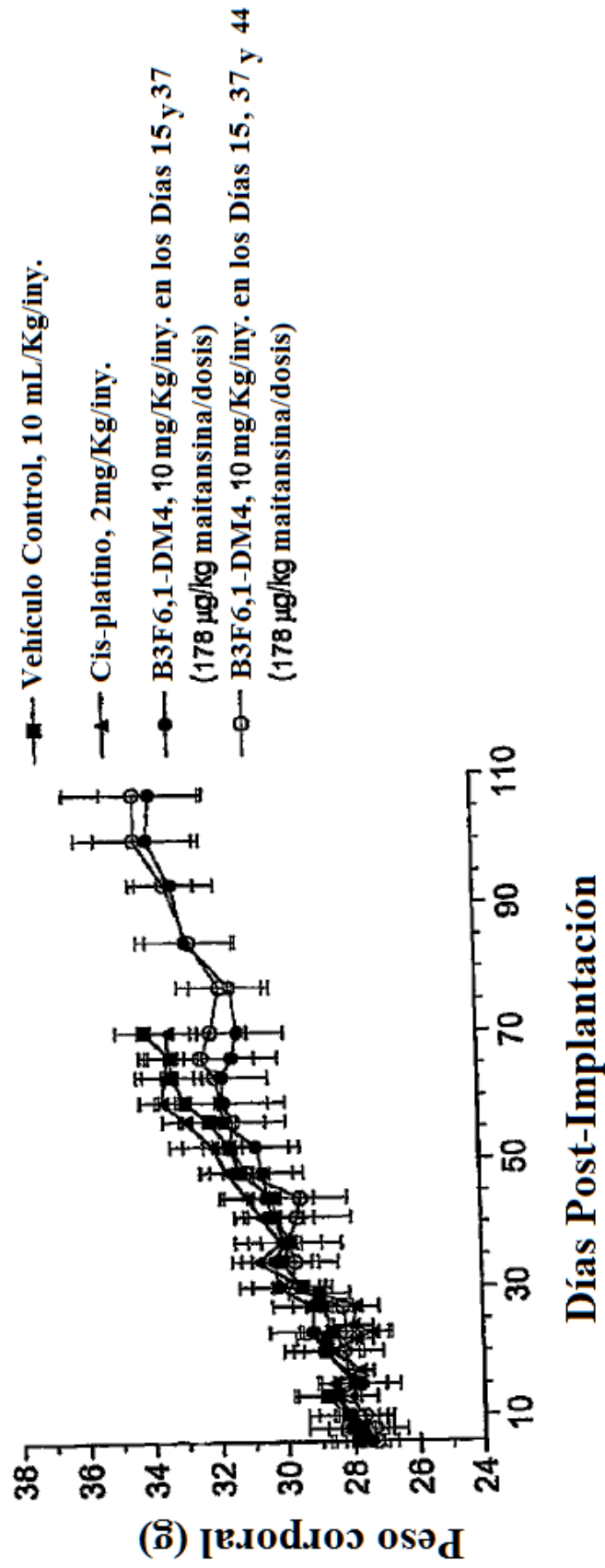


FIGURA 26

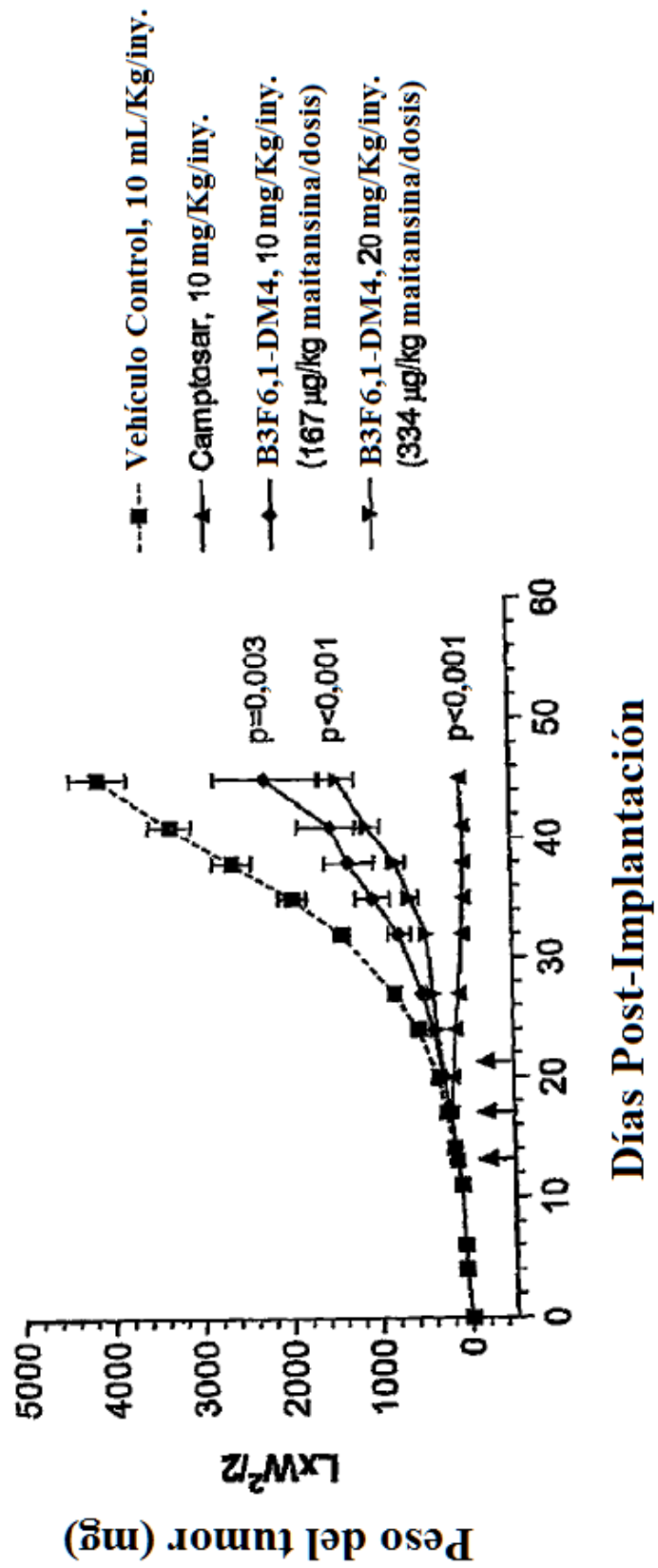


FIGURA 27

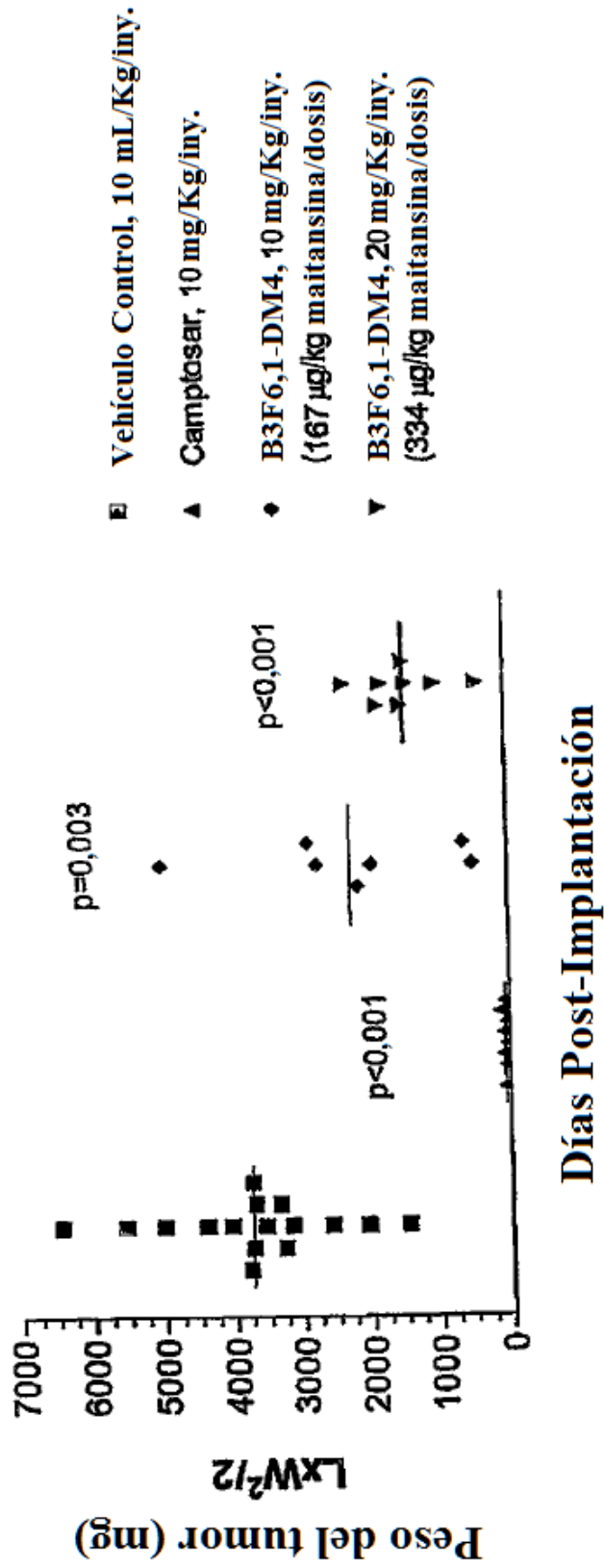


FIGURA 28

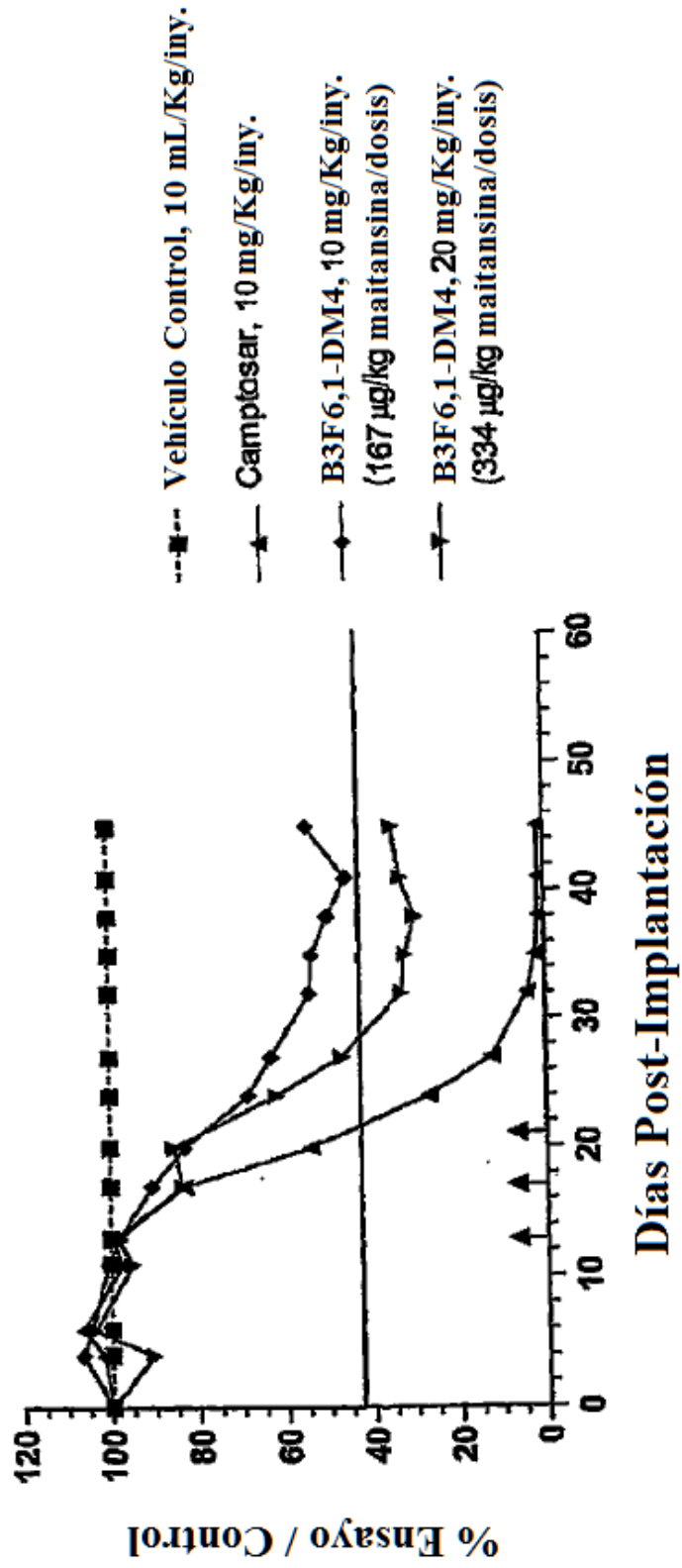


FIGURA 29

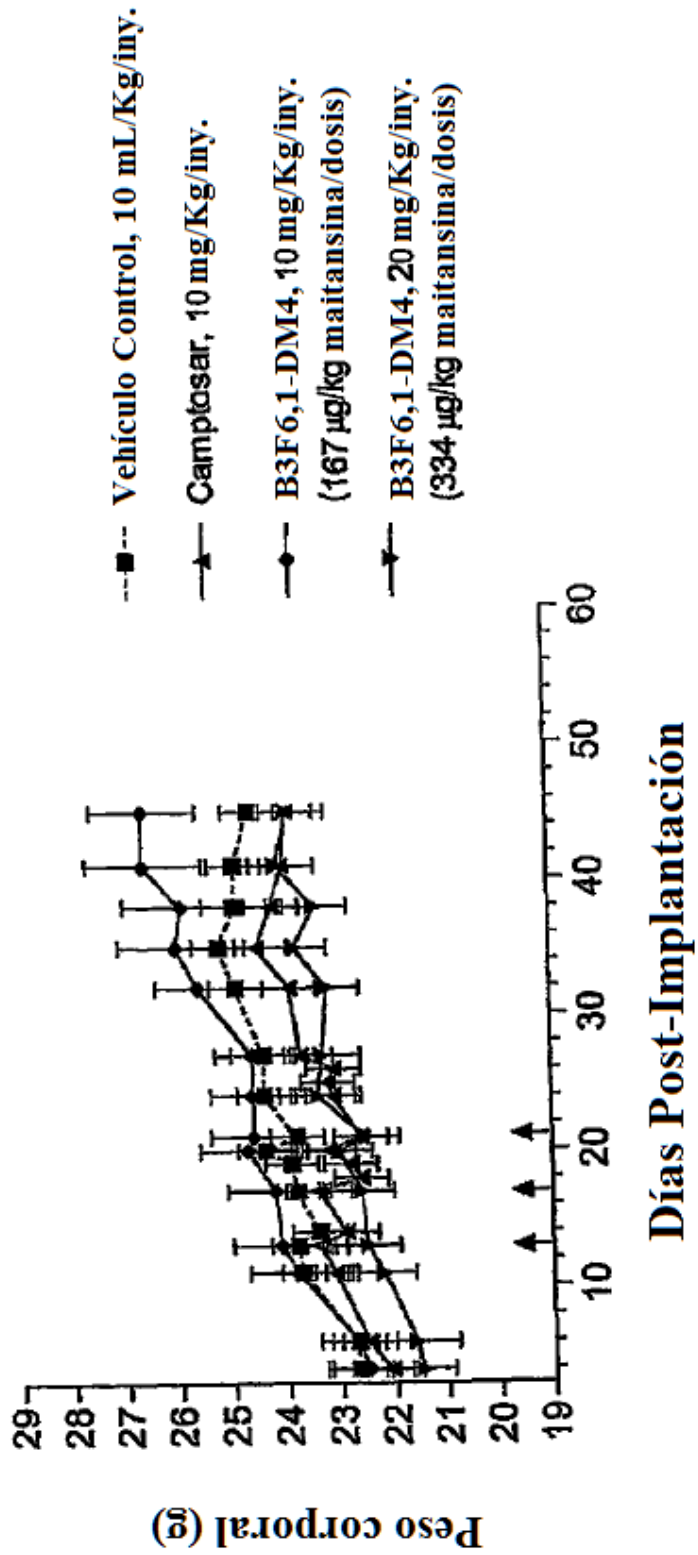


FIGURA 30

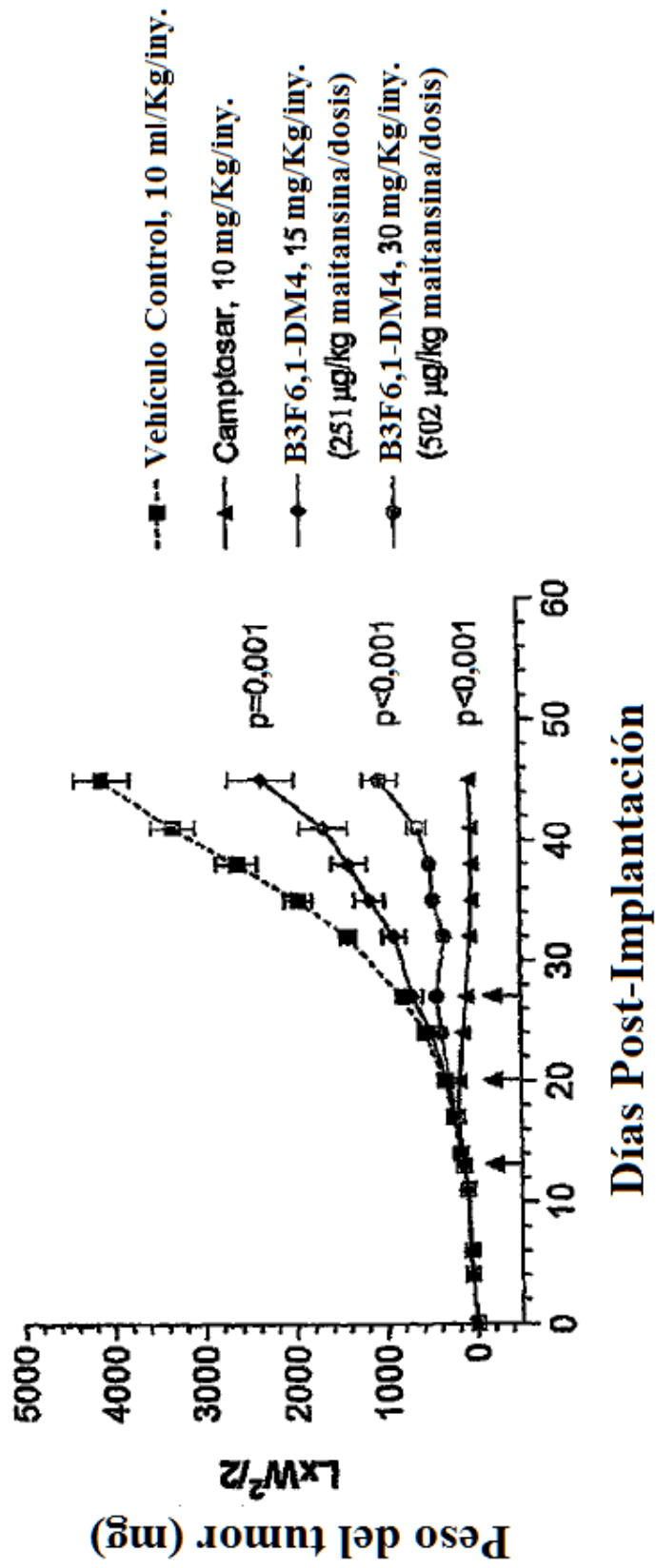


FIGURA 31

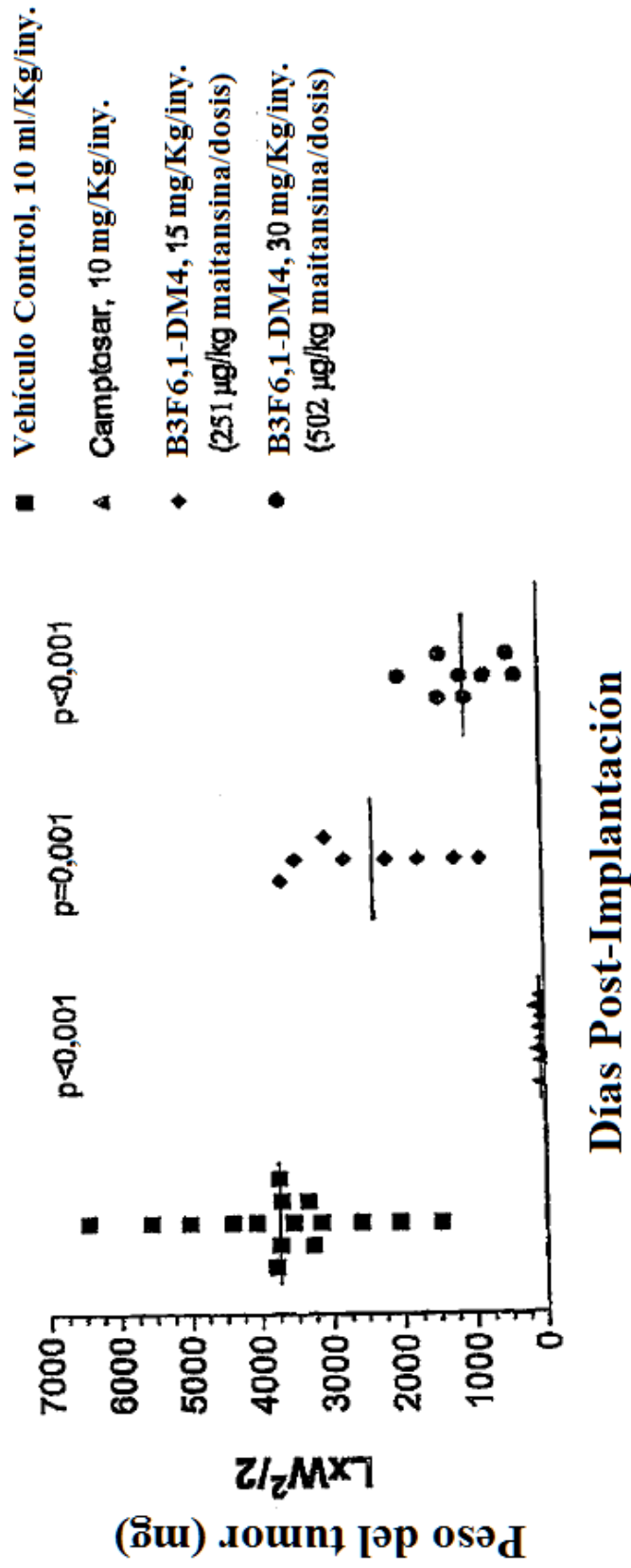


FIGURA 32

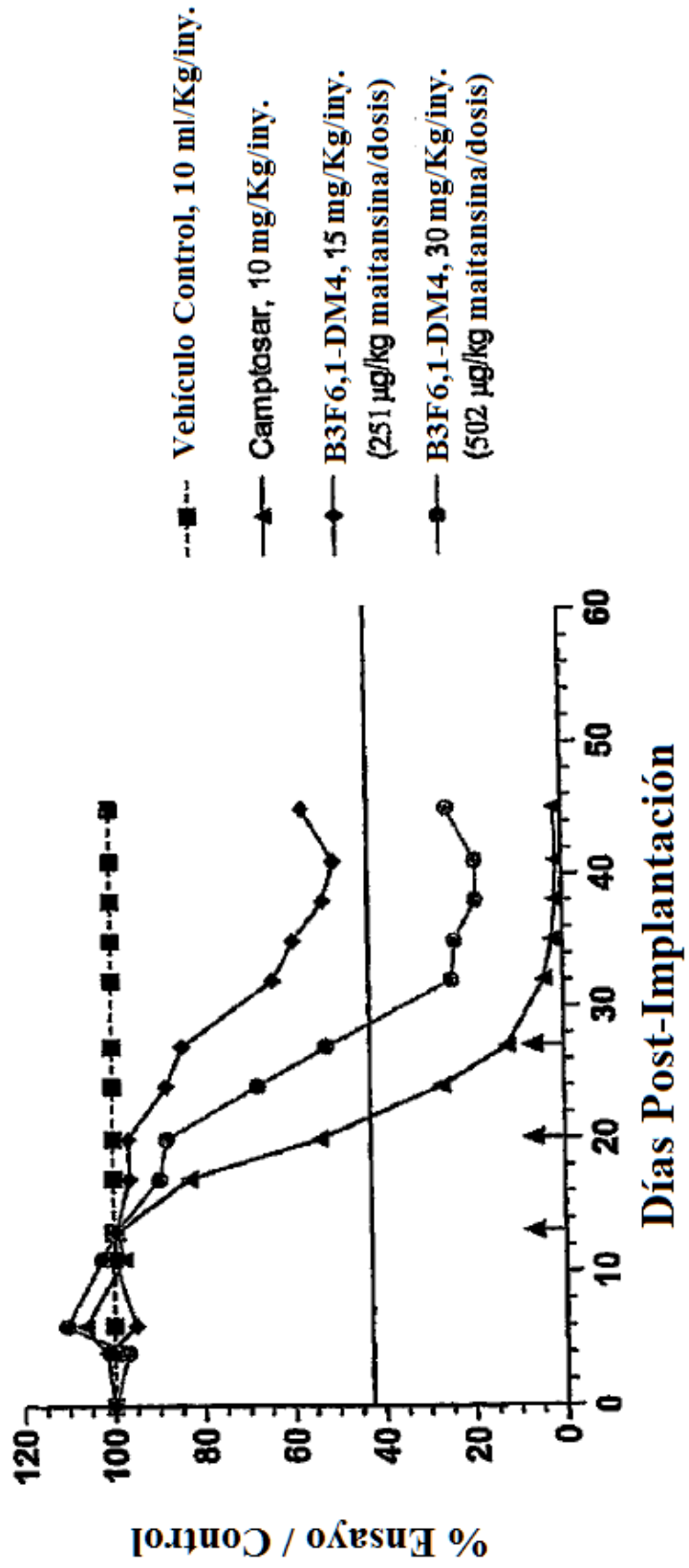


FIGURA 33

