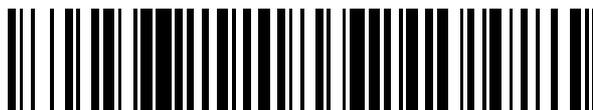


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 373**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2006 E 06847583 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1963372**

54 Título: **Anticuerpos anti-MN y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

12.12.2005 US 749716 P

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

07.11.2013

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
400 MORGAN LANE
WEST HAVEN, CT 06516, US**

72 Inventor/es:

**TAMBURINI, PAUL;
RANGES, GERALD;
ADNANE, LILA;
MCCABE, TIMOTHY;
TRAIL, PAMELA y
HA, SHA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 428 373 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-MN y procedimientos de uso de los mismos

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos y/o fragmentos de los mismos que tienen especificidad por la proteína MN. La invención se refiere además a composiciones de anticuerpo y/o inmunoconjugado y a su uso en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de trastornos relacionados con la MN, por ejemplo cáncer.

2. Antecedentes

- 10 La aparición de cáncer se asocia con mayor frecuencia al envejecimiento, según lo cual el 65 % de todos los casos nuevos de cáncer se registran para pacientes de 65 años de edad y mayores. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en Estados Unidos, superada sólo por las enfermedades cardíacas. De hecho, la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society) ha estimado que 1 de cada 4 personas morirán por cáncer en EE.UU., suponiendo que las tasas de mortalidad actuales no se muevan. Solo en EE.UU., en 2006 se esperan 1.399.790 casos y 564.830 muertes por cáncer. Cabe esperar que la mayoría de estos casos nuevos sean cánceres de colon (106.680), pulmón (172.570) y mama (214.640). Además, se ha previsto que tanto la incidencia como la prevalencia del cáncer aumenten aproximadamente un 15% en los próximos diez años, lo que refleja un índice de crecimiento medio de 1,4% (American Cancer Society, 2006).

- 20 Se ha descubierto que un antígeno asociado con tumores identificado recientemente, MN, una proteína de superficie celular, se expresa en una serie de carcinomas clínicos. Por ejemplo, se ha hallado que la MN se expresa ectópicamente en el 100% de los carcinomas de células renales (Liao, SY, Cancer Res., 1997, 57:2827 - 2831), el 100% de los carcinomas del esófago (Turner JR, Hum. Pathol., 199, 28:740 - 744), más del 90% de los carcinomas cervicouterinos (Liao, SY, Cancer Res., 1997, 57:2827 - 2831), el 76% de los carcinomas de colon malignos (Saarnio, J. et al., Am. J. Path., 1997, 153:279 - 285), el 80% de los carcinomas de pulmón de células no pequeñas (Vermylen P. et al., Eur. Respir. J., 1999, 14:806 - 811), y en el 48% de los cánceres de mama (Chia SK et al., J. Clin. Oncol., 2001, 19:3660 - 3668). Como otros antígenos asociados a tumores, la proteína MN también está presente en las células de un número limitado de tejidos normales, incluyendo, por ejemplo, estómago, mucosa del conducto biliar y las células normales de alta proliferación en el intestino delgado (Saarnio J. et al., J. Histochem. Cytochem., 1998,46:497 - 504).

- 30 Se ha clonado y secuenciado el ADNc de la MN humana (Pastorek, et al., Oncogene, 1994; 9:2877 - 2888). La proteína predicha está constituida por un péptido señal, una secuencia relacionada con el proteoglicano, un dominio de anhidrasa carbónica, (anhidrasa carbónica IX o CA IX), un segmento transmembrana y una cola intracelular corta. El dominio de la anhidrasa carbónica IX cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono en ácido carbónico. Esta actividad puede desempeñar un papel en la regulación de la acidificación local de la porción extracelular de los entornos tumorales, que, en consecuencia, puede conducir a la activación de proteasas y, por último, a metástasis. El documento WO 03/048328 describe anticuerpos neutralizantes anti-MN humanos.

- 40 También se ha investigado la regulación de la expresión de MN. En un aspecto, por ejemplo, la expresión de MN está regulada por aumento por la hipoxia. El complejo transcripcional conocido como factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1) es un regulador de la expresión de MN. De acuerdo con esto, la MN se conoce como un gen efector por HIF-1 que tiene implicaciones en la comprensión de la respuesta tumoral a la hipoxia (Wykoff CC et al., Cancer Res., 2000, 60:7075 - 7083). Además, la expresión de MN se correlaciona con los niveles de hipoxia tumoral y es un indicador pronóstico de la supervivencia global y supervivencia sin metástasis en el cáncer cervicouterino (Loncaster, JA et al., Cancer Res., 2000, 60:7075 - 7083). La expresión de MN también se correlaciona con una densidad vascular media alta, un estadio avanzado del cáncer, el grado de necrosis en el carcinoma de cabeza y cuello (Beasley NJP et al., Cancer Res., 2001, 61:5262 - 5267), escasa supervivencia en el carcinoma nasofaríngeo (Hui EP et al., Clin. Cancer Res., 2002, 8:2595 - 2604), necrosis tumoral, grado más alto, estado negativo al receptor de estrógenos, mayor índice de recaídas y escasa supervivencia para el carcinoma de mama invasivo (Chia SK et al., J. Clin. Oncol., 2001, 19:3660 - 3668). Por tanto, la expresión del antígeno MN se correlaciona con un pronóstico de supervivencia malo y con cánceres de mayor grado.

- 50 Nuevas y mejores terapias para luchar contra estos cánceres agresivos, en particular los dirigidos a la expresión de MN, son altamente deseables y representarían un avance en la técnica. Como tal, la presente invención divulga nuevas composiciones de anticuerpos e inmunoconjugados de los mismos que son útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los cánceres relacionados con la MN.

Sumario de la invención

- 55 La presente invención se refiere a anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales, o fragmentos de anticuerpos, que se unen a la proteína de superficie celular MN y que se pueden usar en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico del cáncer. Los anticuerpos de la invención se pueden conjugar además con agentes citotóxicos, por

ejemplo monometilauristatina-E y/o coadministrarse o formularse con uno o más agentes anticancerosos adicionales. Los anticuerpos anti-MN e inmunoconjugados de la invención se pueden usar en los procedimientos de la invención para tratar y/o diagnosticar y/o vigilar cánceres, por ejemplo tumores sólidos.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o una composición que incluye el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, teniendo el anticuerpo o fragmento un sitio de unión a antígeno que está específicamente dirigido a una proteína MN.

El sitio de unión a antígeno se selecciona de un conjunto de secuencias de CDR específicas que incluyen los siguientes conjuntos de seis CDR:

(a) [3ee9] SEC ID N°: 57, 63, 70, 89, 93 y 97;

10 El sitio de unión a antígeno incluye un conjunto de secuencias de CDR de cadena pesada seleccionadas del grupo constituido por:

(a) [3ee9] SEC ID N°: 57, 63 y 70;

El sitio de unión a antígeno incluye un conjunto de secuencias de CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo constituido por:

15 (a) [3ee9] SEC ID N°: 88, 93 y 97.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento tienen sitios de unión a antígeno que contienen un par de regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera seleccionadas del grupo constituido por:

(a) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 133 y la región variable de cadena ligera SEC ID N° 134;

20 (b) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 135 y la región variable de cadena ligera SEC ID N° 36;

(c) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 137 y la región variable de cadena ligera SEC ID N°: 138;

25 (d) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 139 y la región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 140;

(e) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 141 y la región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 142;

(f) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 143 y la región variable de cadena ligera SEC ID N° 144;

30 (g) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 145 y la región variable de cadena ligera SEC ID N° 146;

(h) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 147 y la región variable de cadena ligera SEC ID N°: 148;

35 (i) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 149 y la región variable de cadena ligera SEC ID N° 150; y

(j) la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 151 y la región variable de cadena ligera SEC ID N°: 152.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden unir a la proteína MN con una constante de disociación de 0,15 nM a 50 nM.

40 En otro aspecto, los anticuerpos o fragmentos de la invención son anticuerpos IgG o fragmentos de IgG. Los anticuerpos o fragmentos también pueden ser anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA, o IgM, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos bioespecíficos, anticuerpos multiespecíficos o anticuerpos quiméricos (p. ej., que comprenden una estructura de anticuerpo humano injertado con una región de unión de anticuerpo humano o no humano, o una estructura de anticuerpo no humano injertado con una región de unión de anticuerpo no humano, o una estructura de anticuerpo no humano injertado con una región de unión de anticuerpo humano o no humano). Los anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, regiones estructurales de anticuerpos de fuentes no humanas, tales como, por ejemplo, de vaca, ratón, llama, camello o conejo. Información adicional sobre la ingeniería de anticuerpos se puede encontrar en la literatura, por ejemplo, Holliger y Hudson, Nature Biotechnology, (Sep, 2005) 23:1126 - 1136. Los fragmentos mencionados en lo que antecede se pueden obtener a partir de una

inmunoglobulina o producirse por un medio adecuado, por ejemplo expresión recombinante, en una forma de fragmento.

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones.

5 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, o composiciones que incluyen los anticuerpos o los fragmentos, pueden incluir un agente citotóxico que está conjugado con el anticuerpo o fragmento. En un aspecto, el agente citotóxico es un monometilauristatina-E (MMAE), sin embargo, también se proporcionan otros agentes citotóxicos, que pueden incluir, por ejemplo, análogos funcionales de la MMAE (p. ej., monometilauristatina-F) y otros agentes citotóxicos, por ejemplo aplidina, azaribina, anastrozol, azacitidina, bleomicina, bortezomib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucilo, cisplatino, irinotecán (CPT-I 1), SN-38, carboplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, docetaxel, dactinomicina, daunomicina glucurónido, daunorrubicina, dexametasona, dietilestilbestrol, doxorubicina, doxorubicina glucurónido, epirubicina glucurónido, etinilestradiol, estramustina, etopósido, etopósido glucurónido, etopósido fosfato, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, fluorouracilo, fluoximesterona, gemcitabina, caproato de hidroxiprogesterona, hidroxiourea, idarrubicina, ifosfamida, L-asparaginasa, leucovorina, lomustina, mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, fenil butirato, prednisona, procarbazona, paclitaxel, pentostatina, PSI-341, semustina estreptozocina, tamoxifeno, taxanos, taxol, propionato de testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, velcade, vinblastina, vinorelbina, vincristina, ricina, abrina, ribonucleasa, onconasa, rapLRI, DNasa I, enterotoxina A de Staphylococcus, proteína antivírica de la hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxinas de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas o combinaciones de los mismos. Cualquiera de los agentes citotóxicos puede también incluir análogos funcionales de los mismos.

25 Las composiciones de la invención pueden incluir, además de los anticuerpos y fragmentos (con o sin los agentes citotóxicos conjugados mencionados en lo que antecede) varios agentes anticancerosos, que pueden incluir, por ejemplo, bleomicina, docetaxel (Taxotere), doxorubicina, edatrexato, erlotinib (Tarceva), etopósido, finasterida (Proscar), flutamida (Eulexin), gemcitabina (Gemzar), genitininib (Iresa), acetato de goserelina (Zoladex), granisetron (Kytril), imatinib (Gleevec), irinotecán (Campto/Camptosar), ondansetrón (Zofran), paclitaxel (Taxol), pegaspargasa (Oncaspar), pilocarpina clorhidrato (Salagen), porfímero sódico (Photofrin), interleucina-2 (Proleukin), rituximab (Rituxan), topotecán (Hycamtin), trastuzumab (Herceptin), Triapine, vincristina, tartrato de de vinorelbina (Navelbine), o anticuerpos terapéuticos o fragmentos de los mismos, o agente antiangiogénico, tal como, por ejemplo, angiostatina, bevacizumab (Avastin®), sorafenib (Nexavar®), baculostatina, canstatina, maspina, anticuerpos o péptidos anti-VEGF, anticuerpos o péptidos anti-factor de crecimiento placentario, anticuerpos anti-Flk-1, anticuerpos o péptidos anti-Fit-1, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de la metaloproteínasa tisular, interferones, interleucina 12, IP-10, Gro- β , trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CM101 Marimastat, polisulfato de pentosán, angiopoyetina 2, interferón alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM- -1470, factor plaquetario 4 o minociclina.

40 El trastorno relacionado con la MN puede incluir, por ejemplo, cáncer, tal como, cáncer de tumor sólido. El tumor sólido puede estar, u originarse en, mama, tracto respiratorio, pulmón, cerebro, órganos reproductores, tracto digestivo, colon, tracto urinario, riñón, esófago, cuello uterino, ojo, hígado, piel, cabeza, cuello, tiroides y paratiroides.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de un trastorno relacionado con MN que se caracteriza por niveles anormales de MN, que comprende comparar los niveles de MN en un tejido o célula que se sospecha que está enfermo con los niveles de MN en un tejido o célula sano correspondiente, en el que unos niveles anormales de MN en la célula o tejido que se sospecha que está enfermo es una indicación de trastorno relacionado con MN, comprendiendo dicha etapa de comparación detectar además mediante inmunoensayo los niveles de MN en el tejido enfermo y el tejido sano con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención.

50 En un aspecto concreto, la invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de un trastorno relacionado con MN, en el que el inmunoensayo incluye las etapas de: (a) detectar los niveles de proteína MN en el tejido sano; (b) detectar los niveles de proteína MN en el tejido que se sospecha que está enfermo; y (c) comparar los niveles de proteína MN de (a) y (b). Unos niveles elevados de la proteína MN en el tejido que se sospecha que está enfermo en comparación con los niveles de la proteína MN en el tejido sano son indicativos de la presencia de un trastorno relacionado con MN.

55 La presente invención también proporciona un kit que comprende los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención o, como alternativa, las composiciones de la invención, y un conjunto de instrucciones para usar el kit en un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con MN o para diagnosticar un trastorno relacionado con MN.

Estas y otras formas de realización se exponen en o son obvias a partir de la siguiente descripción detallada, y están

incluidas en la misma.

Breve descripción de las figuras

La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo pero con la que no se pretende limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, se puede entender mejor junto con las figuras adjuntas, en las que:

- 5 La Figura 1 representa secuencias de ADN de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpo.
- La Figura 2 representa secuencias de proteína de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpo.
- 10 La Figura 3 representa las secuencias de ADN de regiones variables de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos, cada una de las cuales contiene las CDR y regiones estructurales.
- La Figura 4 representa secuencias proteicas de las regiones variables de cadena ligera (VL) y pesada (VH) de anticuerpo, cada una de las cuales contiene las CDR y regiones estructurales.
- 15 La Figura 5 representa las propiedades de unión a MN para los anticuerpos frente a MN de la presente invención.
- La Figura 6 representa la prevención de la adhesión de células tumorales a placas revestidas con MN producidas mediante incubación con un anticuerpo anti-MN.
- La Figura 7 representa la actividad anti-tumoral in vivo en un modelo de xenoinjerto que comprende el tumor MaTu resultante del tratamiento con un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo monoclonal anti-MN 1e4; (ejemplo comparativo).
- 20 La Figura 8 representa la medición mediante FACS de la unión de un anticuerpo anti-MN a la línea celular PC3mm2 que expresa la proteína MN sobre su superficie.
- La Figura 9 representa esquemáticamente el conjugado de anticuerpo (anticuerpo anti-MN conjugado con MMAE).
- 25 La Figura 10a representa gráficos de FACS que representan la unión de 3ee9/MMAE a células MN+ (MaTu), pero no a células MN- (DLD).
- La Figura 10b muestra gráficos de FACS que representan la unión del inmunoconjugado 1E4 a células MN+ (PC3mm2), pero no a células MN- (DLD); (ejemplo comparativo)
- 30 La Figura 10c muestra gráficos de FACS que representan la unión del inmunoconjugado 1aa1 a células MN+ (PC3mm2), pero no a células MN- (DLD); (ejemplo comparativo)
- La Figura 11a muestra imágenes de inmunofluorescencia que representan la internalización de 3ee9/MMAE por las células MN+ y la falta de internalización por células MN-. La internalización de 3ee9/MMAE se muestra como fluorescencia.
- 35 La Figura 11b muestra imágenes de inmunofluorescencia que representan la internalización del inmunoconjugado 1E4 por las células MN+ y la falta de internalización por células MN-. El inmunoconjugado 1E4 internalizado se muestra como fluorescencia; (ejemplo comparativo)
- La Figura 12 muestra una inmunotransferencia que representa inmunoprecipitación específica de proteínas de superficie celular biotiniladas por los anticuerpos frente a MN.
- 40 La Figura 13a representa gráficamente la citotoxicidad de 3ee9/MMAE contra MN+, pero contra células MN-
- La Figura 13b representa gráficamente la citotoxicidad del inmunoconjugado 1E4 contra MN+, pero contra células MN-; (ejemplo comparativo)
- La Figura 13c representa gráficamente la citotoxicidad del inmunoconjugado 1aa1 contra MN+, pero contra células MN-; (ejemplo comparativo)
- 45 La Figura 14 muestra imágenes de inmunofluorescencia que representan la prevención de fusiformación normal por la inhibición de tubulina.
- La Figura 15 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos de MaTu.

La Figura 16 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral del inmunoconjugado 1E4 contra tumores de mama MaTu establecidos; (ejemplo comparativo)

La Figura 17 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral del inmunoconjugado 1aa1 contra xenoinjertos de MaTu; (ejemplo comparativo)

5 La Figura 18 representa gráficamente el índice terapéutico (IT) de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos de MaTu.

La Figura 19 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE y MMAE libre contra xenoinjertos HT-29.

10 La Figura 20 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos HT-29, siguiendo el programa de C7D x 2.

La Figura 21 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos HT-29, siguiendo el programa de C1D x 1.

La Figura 22 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos PC3mm2.

La Figura 23 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos Colo-205.

15 La Figura 24 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos HCT-15.

La Figura 25 representa gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE contra xenoinjertos MIAPaca2 MN- (en el gráfico de la izquierda) y MN+ (en el gráfico de la derecha).

Las Figuras 26a y 26b representan gráficamente la eficacia anti-tumoral de 3ee9/MMAE en combinación con Xeloda® contra xenoinjertos Colo-205 CCR a varias dosis.

20 La Figura 27 muestra imágenes de inmunofluorescencia que representan la localización in vivo de 3ee9 en tumores huMN- MIAPaca2 y MIAPaca2; y

La Figura 28 muestra imágenes de inmunofluorescencia (de muestras histológicas) que representan la inhibición por 3ee9/MMAE de la polimerización de tubulina en HT-29 CCR a dos dosis.

25 La Figura 29 muestra la secuencia nucleotídica completa de una región insertada del vector de expresión en mamíferos 3ee9H+LpCMVUCOE8 (véase el Ejemplo 21) que codifica un anticuerpo IgG humano anti-MN que comprende las regiones variables CDR de las cadenas kappa y pesada de las SEC ID N°: 126 y 125, respectivamente, obtenidas del vector 3ee9pMORPHx9 (véanse los ejemplos 1-3). SEC ID N°: 153.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

30 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. No obstante, las referencias siguientes pueden proporcionar a un experto en la técnica a la que atañe la presente invención una definición general de muchos de los términos usados en la presente invención y puede hacerse referencia a ellas y usarse siempre que dichas definiciones sean consistentes con el significado habitualmente comprendido en la técnica. Dichas referencias incluyen, entre otras, Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991); y Lackie y col., The Dictionary of Cell & Molecular Biology (3ª ed. 1999); y Cellular and Molecular Immunology, Eds. Abbas, Lichtman y Pober, 2ª Edición, W.B. Saunders Company. Se puede consultar cualquier recurso técnico adicional disponible para el experto en la técnica que proporcione definiciones de términos usados en la presente memoria descriptiva que tengan el significado habitualmente entendido en la técnica. Para los fines de la presente invención, los términos siguientes se definen con más profundidad. Términos adicionales se definen en otra parte de la descripción.

45 En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todo de al menos uno, o normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado puede también comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para una recapitulación, véase Jones, y col., (Nature 321:522525, 1986); Reichmann, y col., (Nature 332:323329, 1988); y Presta, (Curr. Struct. Biol. 2:593596, 1992). La preparación de anticuerpos humanizados se puede encontrar en las patentes de EE.UU. n° 7.049.135, 6.828.422, 6.753.136, 6.706.484, 6.696.248, 6.692.935, 6.667.150, 6.653.068, 6.300.064, 6.294.353 y 5.514.548, cada una de las cuales se incorporan en la presente memoria descriptiva en su totalidad.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “Fv de cadena sencilla” o fragmentos de anticuerpos “sFv” comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido Fv además comprende un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que la sFV forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión, véase Pluckthun (*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269- 315, 1994), que se incorpora en la presente memoria descriptiva en su totalidad por referencia.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “muestra biológica”, o “muestra de un paciente” como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una muestra obtenida de un organismo o de componentes (p. ej., células) de un organismo. La muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico. La muestra puede ser una “muestra clínica”, que es una muestra derivada de un paciente. Dichas muestras incluyen, entre otras, esputo, sangre, suero, plasma, células sanguíneas (p. ej., glóbulos blancos), muestras de tejido, muestras de biopsia, orina, fluido peritoneal y fluido pleural, saliva, semen, exudado de mama, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, linfa, citosoles, ascitis, líquido amniótico, lavados vesicales y lavados bronquioalveolares o células de los mismos, entre otras muestras de fluidos corporales. Las muestras de pacientes pueden ser frescas o congeladas, y pueden tratarse con heparina, citrato o EDTA. Las muestras biológicas pueden también incluir secciones de tejidos, tales como secciones congeladas tomadas con fines histológicos.

El término “cáncer” incluye, entre otros, tumores sólidos, tales como cáncer de mama, del tracto respiratorio, cerebral, de órganos reproductores, del tracto digestivo, del tracto urinario, ocular, de hígado, de piel, de cabeza y cuello, de tiroides, de paratiroides, y sus metástasis distantes. El término también incluye sarcomas, linfomas, leucemias y mielomas de células plasmáticas.

Ejemplos de cáncer de mama incluyen, pero no se limitan a carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal in situ y carcinoma lobular in situ. Los ejemplos de cánceres del tracto respiratorio incluyen, pero no están limitados a, carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma de pulmón no de células pequeñas, así como a adenoma bronquial y a blastoma pleuropulmonar. Ejemplos de cánceres de cerebro incluyen, pero no se limitan a glioma del bulbo raquídeo y glioma hipotalámico, astrocitoma cerebelar y cerebral, meduloblastoma, ependimoma, así como a tumor neuroectodérmico y a tumor pineal. Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, entre otros, cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, entre otros, cáncer de endometrio, cervicouterino, de ovarios, vaginal y vulvar, así como el sarcoma del útero. Los tumores del tracto digestivo incluyen, entre otros, cáncer anal, de colon, colorrectal, esofágico, de vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, de intestino delgado y de glándulas salivares. Los tumores del tracto urinario incluyen, entre otros, cáncer de vejiga urinaria, de pene, renal, de pelvis renal, de uréter y de uretra. Cánceres oculares incluye, entre otros, melanoma intraocular y retinoblastoma. Ejemplos de cánceres de hígado incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular (carcinomas de hepatocitos con y sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma del conducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto. Los cánceres de piel incluyen, entre otros, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel distinto al melanoma. Los cánceres de cabeza y cuello incluyen, entre otros, el cáncer de laringe / hipofaringe / nasofaringe / orofaringe, y el cáncer de cavidad oral y labios. Los linfomas incluyen, entre otros, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin y linfoma del sistema nervioso central. Los sarcomas incluyen, entre otros, el sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, el histiocitoma fibroso maligno, el linfosarcoma y el rabdomiosarcoma. Las leucemias incluyen, entre otras, la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mielógena crónica y la tricoleucemia.

Como se usa en la presente invención, el término “epítopo” significa cualquier determinante antigénico localizado sobre un antígeno, por ejemplo la proteína MN, al que el anticuerpo se une a través de un sitio de unión a antígeno. Los determinantes o determinantes antigénicos normalmente constan de grupos de superficie químicamente de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas.

El término “específicamente inmunorreactivo” se refiere a una reacción de unión entre un anticuerpo y una proteína, compuesto o antígeno, que tiene un epítopo reconocido por el sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Esta reacción de unión es determinante de la presencia de una proteína, antígeno o epítopo que tiene el epítopo reconocido entre la presencia de una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biológicas. En el contexto de un inmunoensayo, los anticuerpos específicamente inmunorreactivos se pueden unir a una proteína que tenga el epítopo reconocido y unirse, si lo hacen, en un grado detectablemente menor, a otras proteínas que carezcan del epítopo que estén presentes en la muestra. En un contexto in vivo, “específicamente inmunorreactivo” se puede referir a las condiciones en las que un animal forma una respuesta inmunitaria contra una vacuna o antígeno, por ejemplo una respuesta humoral al antígeno (la producción de anticuerpos contra una vacuna, proteína o compuesto o antígeno presentado a los mismos en condiciones inmunológicamente reactivas) o una respuesta mediada por células (también denominada en la presente memoria descriptiva “respuesta inmunitaria celular”, es decir una respuesta mediada por los linfocitos T contra la vacuna, proteína, compuesto o antígeno presentado a los mismos).

Como se usa en la presente memoria descriptiva “condiciones inmunológicamente reactivas” se usa en el contexto de un inmunoensayo o una reacción in vitro en el que las condiciones físicas de la reacción, incluidas, por ejemplo,

la temperatura, la concentración de sales, el pH, los reactivos y sus concentraciones, y las concentraciones del antígeno y del anticuerpo conocido que es específicamente inmunorreactivo frente al antígeno, se proporcionan o ajustan para permitir la unión del anticuerpo conocido al antígeno. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión al anticuerpo y, normalmente, son éstas las utilizadas en los protocolos de inmunoensayo. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo.

El término “paciente” o “sujeto”, como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye mamíferos (p. ej., seres humanos y animales).

Anticuerpos

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a la MN. Este anticuerpo puede ser útil para varios fines diagnósticos y terapéuticos.

En general, los expertos en la técnica apreciarán que los determinantes más cruciales de la selectividad de los anticuerpos y de la afinidad de unión son las secuencias y las conformaciones resultantes de las regiones de complementariedad (CDR). La mayoría de los anticuerpos contienen seis CDR, tres dentro de la región variable de cadena pesada (VH) y tres dentro de la región variable de cadena ligera (VL). Las secuencias intermedias entre las CDR dentro de las VH y VL son las regiones estructurales que orientan las CDR. Las CDR juntas forman los sitios de unión antigénica dentro de los anticuerpos. El papel crucial de estas CDR en la determinación de las propiedades funcionales de los anticuerpos lleva explotándose mucho tiempo en los procedimientos de humanización de anticuerpos y optimización de anticuerpos. En el procedimiento anterior, las CDR de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo de ratón se transfiere a un anticuerpo humano de diseño estructural similar de modo que tiene como resultado un anticuerpo con las mismas propiedades funcionales y menor inmunogenicidad en el ser humano.

El éxito de este procedimiento es evidente por el número de anticuerpos humanizados que se han comercializado con éxito como terapéuticas humanas e incluyen Herceptin® (trastuzumab, Genentech, Inc., South San Francisco, CA), Synagis® (palivizumab, Medimmune, Inc., Gaithersburg, MD), Campath® (alemtuzumab, Genzyme Oncology, Cambridge, MA), Zenapax® (daclizumab, Roche Pharmaceuticas, Nutley, NJ), Xolair® (omalizumab, Genentech, Inc., South San Francisco, CA), Raptiva® (efalizumab, Genentech, Inc., South San Francisco, CA), Avastin® (bevacizumab, Genentech, Inc., South San Francisco, CA) y Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth-Ayerst, Madison, NJ). Otros ejemplos se han descrito en Singer, et al., (*J. Immunol*, 150:2844 - 2857, 1993); Luo, et al., (*J. Immunol Meth.*, 275:31 - 40, 2002); y Kostelny, et al., (*Int. J. Cancer* 93:556 - 565, 2001).

El procedimiento de optimización de anticuerpos se centra en mejoras en la selectividad de anticuerpos o la afinidad de unión a través de la alteración específica en la secuencia de las CDR. Está bien aceptado dentro del campo de desarrollo de anticuerpos que las CDR codifican las propiedades de afinidad de unión y de selectividad requeridas para usos terapéuticos y diagnósticos, y estas secuencias de CDR se pueden usar para conferir dichas propiedades funcionales deseables a una amplia variedad de estructuras de anticuerpos alternativas usando procedimientos estándar conocidos para los expertos en la técnica. También es posible transferir la actividad de unión a anticuerpo mediante el injerto de CDR del anticuerpo sobre otras proteínas que poseen pliegues de tipo inmunoglobulina tales como otras proteínas dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y no inmunoglobulinas con pliegues similares a las inmunoglobulinas (Nicaise, et al., *Protein Science* 13:1882 - 1891, 2004).

La presente invención contempla cualquier tecnología conocida o adecuada para la preparación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de la invención.

Por ejemplo, la tecnología de expresión en fagos es útil para obtener anticuerpos anti-MN de alta afinidad o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno de la invención para el uso en el diagnóstico y/o tratamiento de un trastorno relacionado con MN, tal como un cáncer relacionado con MN. La tecnología, denominada maduración de afinidad, usa mutagénesis o camino y selección de CDR usando el antígeno de la MN para identificar anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno cuando se compara con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser et al., 1992, *J. Immunology* 149:3903). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos únicos tiene como resultado un repertorio semi-aleatorizado de mutaciones de aminoácidos. Se pueden construir bibliotecas que consisten en un conjunto de clones variantes cada uno de los cuales difiere en una única alteración de aminoácido en una única CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada residuo de CDR. Los mutantes con mayor afinidad de unión por el antígeno se pueden seleccionar por contacto con los mutantes inmovilizados que contienen antígeno marcado. Se puede usar cualquier procedimiento de selección conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con mayor avidéz por el antígeno (p. ej., ELISA) (véase Wu et al., 1998, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994). El camino de CDR también se puede usar para aleatorizar la cadena ligera (véase, Schier et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551, incorporado por referencia).

En un ejemplo concreto, MorphoSys AG (Alemania) proporciona una tecnología de fago-anticuerpo que se puede usar para generar anticuerpos completamente humanos. La biblioteca Morphosys HuCAL GOLD proporciona una

serie de avances sobre las versiones anteriores de la tecnología (Knappik, et al., J. Mol. Biol. 296:57 - 86, 2000) incluyendo la biblioteca HuCAL-Fab 1 descrita en Rauchenberger, et al., (J. Biol. Chem. 278:38194 - 38205, 2003). Como las versiones anteriores, HuCAL GOLD incorpora un diseño de anticuerpos humanos que portan las secuencias estructurales consenso humanas y patrones de la variabilidad de la CDR que simulan la diversidad de las secuencias humanas naturales. No obstante, la diversidad se extiende en HuCAL GOLD para incluir las seis CDR de anticuerpos. Además, la recuperación de anticuerpos de alta afinidad aumenta mediante la característica CysDisplay™ (Kretzschmar y von Ruden, Curr. Opin. Biotechnol. 13:598 - 602, 2002). Los anticuerpos derivados con esta tecnología exhiben una probabilidad muy reducida de inmunogenicidad.

Las tecnologías de expresión en fagos, tales como las disponibles en Morphosys, se conocen en la técnica y se pueden hacer referencias también a Boehncke WH et al., Br J Dermatol. (2005), Nov;153(5): 1092; Simon Moroney et al., Modern Biopharmaceuticals; Edited by J. Knaeblein, Wiley-VCH Verlag (2005); Ralf Ostendorp et al., Antibodies, Volumen 2: Novel technologies and therapeutic use, p.13 - 52, (2004), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; R. Rauchenberger et al., J Biol Chem., (2003), Oct 3, 278(40): 38194 - 38205; T. Kretzschmar et al., Curr Opin Biotechnol., (2002), Dec, 13(6):598 - 602; Krebs B et al, J Immunol Methods, (2001), Aug 1, 254(1 - 2); M. Marget et al., Tissue Antigens, (2000), 56: 1 - 9; A. Knappik et al., J. Mol Biol., (2000), Feb 11, 296 (1): 57 - 86; y A. Pluckthun et al., Immunotechnology, (1997), Jun; 3(2): 83 - 105.

Como ejemplo, los anticuerpos con unión a MN y actividad neutralizante de la adhesión celular se pueden identificar usando la tecnología MorphoSys. La proteína MN puede revestir una placa de microtitulación o una perla magnética e incubar con la biblioteca de fagos MorphoSys HuCAL-GOLD Fab. Los Fab unidos a fagos que no se unen a MN se pueden lavar de la placa, dejando solo el fago que se une a MN. El fago unido se puede eluir mediante adición de un agente reductor tiol tal como ditiotreitól (DTT) que tiene como resultado la escisión del puente disulfuro que une el anticuerpo al fago. La población recuperada del fago se puede enriquecer con fagos que expresan fragmentos de anticuerpos de unión a MN y se pueden amplificar mediante infección de huéspedes de *E. coli*. Este proceso de *panning* se puede repetir usando la población enriquecida de fagos para enriquecer adicionalmente una población de anticuerpos unidos a fago que se unen a MN. La secuencia génica que codifica los Fab se pueden escindir después usando técnicas de clonación estándar y transferir a un vector de expresión, tal como un vector de expresión bacteriana (p. ej., *E. coli*) o un vector de expresión en mamíferos, que se usa para transformar una línea celular huésped, tal como CHO o la línea celular de expresión *E. coli*. Los Fab del conjunto enriquecido se pueden expresar y purificar.

Como alternativa, se puede realizar el *panning* usando células que expresan MN como antígeno. Por ejemplo, las células transfectadas con el antígeno MN se pueden marcar con biotina. Estas células transfectadas se pueden mezclar después con células no transfectadas con MN no marcadas en una proporción marcado:sin marcar de 1:10. La biblioteca de fagos se añade a las células y las células portadoras de MN biotiniladas se capturan con perlas magnéticas unidas a estreptavidina que están unidas a un imán. Los fagos inespecíficos se eliminan mediante lavado y las células portadoras de MN se eluyen específicamente eliminando el campo magnético. Estos fagos unidos específicamente se pueden amplificar para otras rondas de *panning* celular o se pueden alternar con *panning* de péptidos y/o proteínas.

Los anticuerpos pueden producirse mediante otras técnicas, tal como se describe a continuación. Por ejemplo, otro enfoque para obtener anticuerpos es seleccionar una biblioteca de ADN de linfocitos B como se describe en Dower, et al., (documento WO 91/17271) y McCafferty, et al., (documento WO 92/01047). En estos procedimientos, se producen bibliotecas de fagos en las que los miembros muestran diferentes anticuerpos sobre sus superficies externas. Normalmente, los anticuerpos se expresan como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos que se expresan en fagos se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad de la unión a una proteína seleccionada.

En una variación del procedimiento de expresión en fagos se pueden producir anticuerpos humanos que tienen especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado (documento WO 92120791). En este procedimiento, la región variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado (p. ej., 5C7.29) se puede usar como material de partida. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de cadena ligera como material de partida, se puede construir una biblioteca de fagos en la que los miembros muestran la misma región variable de cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una región variable de cadena pesada diferente. Las regiones variables de cadena pesada pueden obtenerse de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humanas reorganizadas. Se selecciona un fago que muestra una fuerte unión específica por una proteína (p. ej., al menos 10 nM o al menos 1 nM). La región variable de cadena pesada humana de este fago sirve como material de partida para construir una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago expresa la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de expresión) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera pueden obtenerse de una biblioteca de regiones variables de cadena ligera humanas reorganizadas. De nuevo, se seleccionan fagos que muestran una fuerte unión específica.

Como otro ejemplo, se pueden producir anticuerpos usando la metodología del trioma. El enfoque básico y un ejemplo de pareja de fusión celular, SPAZ-4 para usar en este enfoque, han sido descritos por Oestberg, et al., (Hybridoma 2:361 - 367, 1983; patente de EE.UU. N° 4.634.664); y Engleman, et al., (patente de EE.UU. N° 4.634.666). Las líneas celulares productoras de anticuerpo obtenidas mediante este procedimiento se denominan

tríomas porque descienden de tres células, dos humanas y una de ratón. Inicialmente, una línea de mieloma de ratón se condensa con un linfocito B humano para obtener una célula híbrida xenogénea no productora de anticuerpos, tal como la línea celular SPAZ-4. La célula xenogénea se condensa después con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular tríoma productora de anticuerpos. Se ha descubierto que los tríomas producen anticuerpos de un modo más estable que los híbridos normales fabricados de células humanas.

Los linfocitos B se obtienen de sangre, bazo, ganglios linfáticos o médula ósea de un donante humano. Normalmente no es deseable la inmunización *in vivo* de un humano vivo con la proteína debido al riesgo de iniciar una respuesta dañina. Por tanto, normalmente los linfocitos B se inmunizan *in vitro* con una proteína (p. ej., MN) o un fragmento antigénico de la misma o una célula portadora de dicha proteína (p. ej., MN). Fragmentos epitópicos específicos que consisten esencialmente en los segmentos de aminoácidos que se unen a uno de los anticuerpos murinos de ejemplo se pueden usar para inmunización *in vitro*. Normalmente, los linfocitos B se exponen a un antígeno durante un periodo de 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.634.666) suplementado con 10% de suero humano:

Los linfocitos B inmunizados se pueden condensar a una célula híbrida xenogénea tal como SPAZ-4 mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden tratar con 40 - 50 % de polietilenglicol de PM 1.000 - 4.000 durante aproximadamente 5-10 minutos a aproximadamente 30°C. Las células se pueden separar de la mezcla de fusión y propagar en medio selectivo para los híbridos deseados (p. ej., HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida se pueden identificar analizando en el medio de cultivo del tríoma su capacidad para unirse a una proteína (p. ej., MN) usando los mismos procedimientos que se han tratado anteriormente para anticuerpos no humanos. Los tríomas productores de anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se pueden subclonar, por ejemplo, mediante la técnica de dilución límite, y cultivar *in vitro* en medio de cultivo.

Aunque los tríomas son genéticamente estables, pueden no producir anticuerpos a niveles muy altos. Los niveles de expresión se pueden incrementar clonando genes de anticuerpos del tríoma en uno o más vectores de expresión y transformar el vector en una línea celular tal como las líneas celulares para la expresión de inmunoglobulinas recombinantes o humanizadas.

Los anticuerpos humanos con reacción cruzada con una proteína (p. ej., MN) también se pueden producir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de la inmunoglobulina humana. Normalmente, el locus de la inmunoglobulina endógena de dichos mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivado. El segmento del locus de la inmunoglobulina humana puede incluir secuencias no reorganizadas de componentes de las cadenas pesada y ligera. Tanto la inactivación de los genes de inmunoglobulina endógena como la introducción de genes de inmunoglobulina exógena se pueden conseguir mediante recombinación homóloga dirigida o mediante introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos resultantes de este procedimiento pueden reorganizar funcionalmente las secuencias del componente inmunoglobulina y expresar un repertorio de anticuerpos de varios isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar genes de inmunoglobulina endógena. La producción y las propiedades de los mamíferos que tienen estas proteínas se describen con detalle en, por ejemplo, Lonberg, et al., (documento WO 93/12227); y Kucherlapati, (documento WO 91/10741). La reacción cruzada de anticuerpos anti-MN humanos se puede obtener inmunizando un mamífero no humano transgénico como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, condensando linfocitos B de dichos mamíferos con líneas celulares de mieloma adecuadas usando tecnología de Kohler-Milstein convencional (Kohler y Milstein, Nature 256:495 - 497, 1975).

Los anticuerpos de ratón o de otros no humanos que reaccionan de forma cruzada con una proteína (p. ej., MN) se pueden obtener usando varias estrategias de inmunización. En algunas estrategias, los animales no humanos (normalmente mamíferos no humanos tales como ratones) se pueden inmunizar con antígenos MN. Los inmunógenos pueden incluir células transfectadas de forma estable con MN y expresan MN en su superficie celular, y proteína MN o fragmentos epitópicos que contienen los segmentos de estas moléculas que se unen a los anticuerpos de ejemplo que reaccionan de forma cruzada. Las células productoras de anticuerpos obtenidas de animales inmunizados se pueden inmortalizar y seleccionar para la producción de un anticuerpo que se une específicamente a MN (p. ej., Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, C.S.H.P., N.Y., 1988). La unión se puede detectar usando, por ejemplo, un anticuerpo secundario adecuado portador de un segundo marcador. Después, los anticuerpos de reacción cruzada se pueden someter a selección para determinar su capacidad para dirigir la citotoxicidad celular selectiva a las células que expresan MN.

Ensayos de unión

Se puede usar cualquier medio para describir la fuerza de la unión (o la afinidad) entre un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y un antígeno de la invención (proteína MN). Por ejemplo, la constante de disociación, K_d ($K_d = k_2/k_1 = [\text{anticuerpo}][\text{antígeno}] / [\text{complejo anticuerpo-antígeno}]$) se puede determinar mediante análisis cinéticos estándar que se conocen en la técnica. Los expertos en la técnica apreciarán que la constante de disociación indica la fuerza de la unión entre un anticuerpo y un antígeno en términos de lo fácil que es separar el complejo. Si se requiere una concentración elevada del anticuerpo y del antígeno para formar el complejo, la fuerza

o afinidad de la unión es baja, lo que tiene como resultado una K_d más alta. Se deduce que cuanto menor es la K_d (expresada en unidades de concentración, por ejemplo molar o nanomolar), más fuerte es la unión.

La afinidad se puede evaluar y/o medir mediante varias técnicas e inmunoensayos conocidos, incluyendo, por ejemplo, ensayo inmuno específico ligado a enzima (ELISA), análisis de interacción biomolecular (BIA) (p. ej., Sjolander y Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:2338 - 2345, 1991; Szabo, et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699 - 705, 1995), y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para cuantificar la unión del anticuerpo a las células que expresan MN. El BIA es una tecnología para analizar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcaje de ninguno de los interactuantes (p. ej., BIAcore™). BIAcore se basa en la determinación de cambios en la resonancia de plasmón superficial de fenómeno óptico (SPR) en reacciones a tiempo real entre moléculas biológicas, tales como un anticuerpo de la invención y un antígeno proteico MN. Las referencias en relación con la tecnología BIAcore se pueden encontrar también en las solicitudes publicadas de EE.UU. N° 2006/0223113, 2006/0134800, 2006/0094060, 2006/0072115, 2006/0019313, 2006/0014232 y 2005/0199076.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de la invención que se unen específicamente a una proteína (p. ej., MN) proporcionan una señal de detección, por ejemplo, preferentemente, al menos aproximadamente 5 veces más alta, más preferentemente, al menos aproximadamente 10 veces más alta y todavía más preferentemente, al menos aproximadamente 20 veces más alta que una señal de detección proporcionada para otras proteínas cuando se usa en un ensayo inmunoquímico. Como tales, estos anticuerpos se pueden usar para inmunoprecipitar una proteína (p. ej., MN) en la solución.

Los anticuerpos y fragmentos de la invención se pueden analizar para determinar la unión inmuno específica (o la unión que es “específicamente inmunorreactiva”, que se define en el presente documento) mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los ensayos que implican un anticuerpo y un antígeno se conocen como “inmunoensayos”, que se pueden usar en la presente invención para caracterizar los anticuerpos y los antígenos de la invención. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, entre otros, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como transferencias de tipo western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzima), inmunoensayos de tipo “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por citar algunas. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York) y se pueden realizar sin experimentación indebida. Ejemplos de inmunoensayos se describen brevemente más adelante (pero no se pretende que sean limitantes).

Generalmente, los protocolos de inmunoprecipitación comprenden lisis de una población de células en un tampón de lisis, tal como tampón RIPA (1% de NP-40 o Triton X-100, 1% de desoxicolato sódico, 0,1% de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M a pH 7,2, 1% de Trasyolol) suplementado con fosfatasa proteica y/o inhibidores de la proteasa (p. ej., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato sódico), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (p. ej., 14 horas) a 4° C, añadir perlas de sefarosa con proteína A y/o proteína G al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4 °C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en tampón de SDS/muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno concreto se puede evaluar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo western. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el fondo (p. ej., aclarar previamente el lisado celular con perlas de sefarosa). Para una discusión adicional sobre los protocolos de inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.16.1.

Generalmente, el análisis de transferencia de tipo western comprende preparar muestras de proteínas, electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (p. ej., 8 % 20 % SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra proteica del gel de poliacrilamida a una membrana, tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (p. ej., PBS con 3 % de BSA o leche desgrasada), lavar la membrana en tampón de lavado (p. ej., PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado; bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radioactiva (p. ej., ^{32}P o ^{125}I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional sobre los protocolos de transferencia de tipo western, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York en 10.8.1.

Los ELISA normalmente comprenden preparar el antígeno, revestir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que estar conjugado con un compuesto detectable; en su lugar, se puede añadir al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo

de interés) conjugado a un compuesto detectable. Además, en lugar de revestir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede recubrir el pocillo. En este caso, un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable se puede añadir tras la adición del antígeno de interés al pocillo revestido. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional sobre los ELISA, véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1.

Los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de la invención también se pueden purificar en cualquier célula que exprese los anticuerpos, incluidas las células huésped que se han transfectado con constructos de expresión que codifican anticuerpo. Las células huésped se pueden cultivar en condiciones en las que se expresan los anticuerpos. Los anticuerpos purificados y/o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno se pueden separar de otros componentes celulares que se pueden asociar con los anticuerpos en la célula, tal como ciertas proteínas, hidratos de carbono o lípidos, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, entre otros, cromatografía por exclusión de tamaño, fraccionamiento con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis en gel preparativa. La pureza de las preparaciones se puede evaluar por medios conocidos en la técnica, tal como electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Una preparación de anticuerpos purificados pueden contener más de un tipo de anticuerpo (p. ej., anticuerpos con las características de unión a MN y neutralizantes).

Como alternativa, los anticuerpos se pueden producir usando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos o porciones de la secuencia de anticuerpos (p. ej., Secuencias de CDR), tal como mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (p. ej., Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 - 2154, 1963; Roberge, et al., *Science* 269:202 - 204, 1995). La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Opcionalmente se pueden sintetizar por separado fragmentos de anticuerpos y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

Una vez que un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención se identifica u obtiene mediante, por ejemplo, cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo incluyendo procedimientos tradicionales de producción de anticuerpos (p. ej., procedimientos de inmunización animal), producción monoclonal o por medios de ADN recombinante, puede ser preferible llevar a cabo otras etapas para caracterizar y/o purificar y/o modificar el anticuerpo. Por ejemplo, puede ser deseable preparar un fragmento de anticuerpo inmunorreactivo o preparar una composición purificada de alta titulación del anticuerpo identificado deseable o analizar la inmunorreactividad del anticuerpo identificado o fragmento del mismo. La presente invención contempla cualquier procedimiento conocido y adecuado para caracterizar, purificar o analizar los anticuerpos de la presente invención y cabe esperar que cualquier experto en la técnica a la que la invención pertenece tendrá el nivel requerido de conocimientos técnicos y recursos, por ejemplo manuales o tratados técnicos, para conseguir cualquier caracterización, purificación y/o ensayo de los anticuerpos de la invención sin experimentación indebida.

En aspectos concretos, los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos bien conocidos, que incluyen, entre otros, purificación de la proteína A, precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción de carga hidrófoba y cromatografía de lectina. La cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("HPLC") también se puede emplear para purificación. Véase, por ejemplo, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, o *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (19972001), por ejemplo los Capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

El término "aislar" en el contexto de los anticuerpos hace referencia a cualquier procedimiento conocido en la técnica mediante el cual se purifican anticuerpos. En la técnica se conocen bien procedimientos para purificar anticuerpos y la presente invención contempla cualquier procedimiento adecuado que conozca un experto en la técnica y que no requiera experimentación indebida. Por ejemplo, procedimientos cromatográficos, tales como, por ejemplo, cromatografía de inmunoafinidad (ligando inmovilizado para unir y atrapar el anticuerpo de interés), cromatografía de afinidad, precipitación de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño, así como electroforesis, se pueden encontrar descritos en la literatura técnica, por ejemplo en *Methods in Enzymology*, Volume 182, *Guide to Protein Purification*, Eds. J. Abelson, M. Simon, Academic Press, 1ª Edición, 1990. Por tanto, los expertos en la técnica conocen los materiales adecuados para realizar dichas etapas de purificación, tales como etapas cromatográficas. Dichos procedimientos son adecuados para purificación de cualquiera de los anticuerpos, antígenos o cualquier fragmento de los mismos de acuerdo con la invención como se ha descrito en el presente documento.

Ciertas realizaciones pueden requerir la purificación o aislamiento de proteínas expresadas o anticuerpos o fragmentos de los mismos de una célula huésped o una porción de la misma. En la presente invención se contemplan procedimientos convencionales para aislar proteínas recombinantes de células huésped transformadas. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, aislamiento de la proteína o fragmentos de interés mediante extracción inicial de sedimentos celulares o de medio de cultivo celular, seguido de desalación, y se pueden usar una o más etapas de cromatografía, incluyendo etapas cromatografía de intercambio iónico acuosa, cromatografía de exclusión

por tamaño, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de afinidad, para aislar la proteína o fragmento recombinante. Guías en los procedimientos para purificar proteínas se pueden encontrar en la literatura técnica, incluyendo, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, Volume 182, *Guide to Protein Purification*, Eds. J. Abelson, M. Simon, Academic Press, 1ª Edición, 1990.

- 5 Las moléculas sintetizadas químicamente se pueden purificar sustancialmente mediante cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido sintético se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de los aminoácidos (p. ej., usando la degradación de Edman).

Polinucleótidos

- 10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican los anticuerpos contra MN o los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de la invención. Estos polinucleótidos se pueden usar para, por ejemplo, producir cantidades de los anticuerpos para uso terapéutico o diagnóstico o para producir muestras de anticuerpos o fragmentos para usar en inmunoensayos de la invención.

- 15 Los polinucleótidos que se pueden usar para codificar, por ejemplo, cada una de las tres CDR dentro de las regiones VH de anticuerpo se describen en las SEC ID N°: 57, 63, 70. Los polinucleótidos que se puede usar para codificar, por ejemplo, cada una de tres CDR dentro de las regiones VL de anticuerpos se describen en las SEC ID N°: 89, 93, 97.

- 20 Los polinucleótidos de la presente invención también se pueden aislar de células huésped, liberar de otros componentes celulares tales como componentes de membrana, proteínas y lípidos de acuerdo con cualquier procedimiento conocido o adecuado en la técnica. Los polinucleótidos pueden aislarse usando técnicas de purificación de ácido nucleico estándar o sintetizarse usando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante el uso de un sintetizador automático. Los procedimientos para aislar polinucleótidos son rutinarios y se conocen en la técnica. Se puede usar cualquiera de dichas técnicas para obtener un polinucleótido para obtener polinucleótidos aislados que codifican anticuerpos de la invención. Por ejemplo se
25 pueden usar enzimas de restricción y sondas para aislar polinucleótidos que codifican anticuerpos.

- Se pueden preparar moléculas de ADNc que codifican anticuerpos con técnicas estándar de biología molecular, usando ARNm como molde. Después, las moléculas de ADNc se pueden replicar usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y divulgadas en manuales tales como Sambrook, et al., (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989, Vol. 1 -
30 3. Se puede usar una técnica de amplificación, como la PCR, para obtener copias adicionales de los polinucleótidos.

- Para expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo, el polinucleótido se puede insertar en un vector de expresión que contenga los elementos necesarios para las transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Se pueden usar procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican anticuerpos y los elementos adecuados de control de la
35 transcripción y la traducción. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en, por ejemplo, Sambrook, et al. (1989) and in Ausubel, et al., (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995).

- Se pueden utilizar varios sistemas de expresión en vector/huésped para contener y expresar secuencias que codifiquen anticuerpos. Estos incluyen, ente otros, microorganismos, tales como bacterias transformadas con
40 vectores de expresión con ADN recombinante de bacteriófago, plásmido o cósmico, levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión en virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (p. ej., plásmidos Ti o pBR322) sistemas de células animales.

- Los elementos control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas del vector, potenciadores, promotores, regiones no traducidas en 5' y 3', que interactúan con las proteínas de las células huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar de fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y del huésped utilizados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluidos los promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, al clonar en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles como el promotor híbrido LacZ del fagemido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.) o el plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares. En células de insectos se puede
50 usar el promotor de la polihidrina del baculovirus. En el vector se pueden clonar promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (p. ej., genes de las proteínas del shock térmico, RUBISCO y de almacenamiento) o de virus vegetales (p. ej., promotores víricos o secuencias líder). En los sistemas de células de mamíferos se pueden usar promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos, por ejemplo un promotor del CMV. Es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de una secuencia de nucleótidos que codifique un anticuerpo, los vectores basados en los virus SV40 o EBV se pueden usar con un marcador seleccionable adecuado.

Las construcciones de expresión contendrán además sitios para el inicio y la terminación de la transcripción, y, en la

región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción de codificación de los transcritos maduros expresados por las construcciones pueden incluir, además, un codón de iniciación de la traducción al comienzo y un codón de terminación (p. ej., UAA, UGA o UAG) colocado adecuadamente al final del ARNm que se va a traducir, siendo UAA y UAG preferidos para expresión en células de mamífero o eucariotas.

- 5 Los vectores de expresión también pueden incluir al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen, entre otros, marcadores de células de mamífero, tales como metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR) (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; y 5,179,017), ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico o glutamina sintetasa (GS) (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739), y marcadores de células bacterianas, tales como genes de resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina. Medios de cultivo adecuados y las condiciones para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica. Los vectores adecuados serán evidentes para el experto en la técnica,

- 15 Se puede usar cualquier procedimiento conocido adecuado para introducir un ADN de la invención, por ejemplo un vector de expresión de ADN que contiene una o más secuencias que codifican anticuerpos en una célula huésped. Algunos procedimientos incluyen transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos conocidos. En la técnica se describen dichos procedimientos, tal como en Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989) Vol. 1 - 3, Capítulos 14, 16 y 18).

- 20 Los expertos en la técnica conocen numerosos sistemas de expresión disponibles para expresión de un ácido nucleico que codifica anticuerpos o porciones de los mismos de la presente invención.

- 25 Ilustrativos de cultivos celulares útiles para la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención son células de mamífero. Los sistemas de células de mamífero a menudo estarán en forma de monocapas de células, aunque también se pueden usar suspensiones de células de mamífero o biorreactores. En la técnica se han desarrollado numerosas líneas celulares huésped adecuadas de expresión de proteínas glicosiladas intactas e incluyen las líneas celulares CHO, CHO-S, COS-1 (p. ej., ATCC CRL 1650), COS-7 (p. ej., ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (p. ej., ATCC CRL-10), CHO (p. ej., ATCC CRL 1610) y BSC-1 (p. ej., ATCC CRL-26), células Cos-7, células CHO, células hep G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, células 293, células HeLa y similares, que están fácilmente disponibles en, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo.

- 30 Vectores de expresión para estas células pueden incluir una o más de las siguientes secuencias de control de la expresión, tales como, entre otros, un origen de replicación, un promotor (p. ej., promotores tardíos o tempranos de SV40, el promotor de CMV (p. ej., patentes de EE.UU. N° 5,168,062; 5,385,839), un promotor de HSV tk (fosfoglicerato quinasa), un promotor alfa de EF-1 (patente de EE.UU. n° 5.266.49 1), un promotor de inmunoglobulina; un potenciador y/o sitios de información de progresión, tales como los sitios de unión al ribosoma, los puntos de corte en el ARN, sitios de poliadenilación (p. ej., un sitio de adición de poli A de T Ag grande de SV40) y secuencias terminadoras de la transcripción. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención se conocen o están disponibles en, por ejemplo, el catálogo de la Colección Americana de Cultivos Tipo de líneas celulares e hibridomas u otros conocidos o fuentes comerciales.

- 40 Cuando se usan células huésped eucariotas se pueden incorporar en el vector secuencias de poliadenilación o de terminación de la transcripción. Un ejemplo de una secuencia de terminación es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina. También se pueden incluir secuencias para corte y empalme preciso de transcritos. Un ejemplo de secuencia de corte y empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773 781 (1983)). Adicionalmente, se pueden incorporar en el vector secuencias génicas para controlar la replicación en la célula huésped, como se sabe en la técnica.

- 45 Textos generales que describen técnicas de biología molecular adicionales útiles en el presente documento, incluyendo la preparación de anticuerpos, incluyen Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, Inc.); Sambrook, et al., (Molecular Cloning A Laboratory Manual, (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989) Vol. 1 - 3); Current Protocols in Molecular Biology, (F. M. Ausabel et al. [Eds.], Current Protocols, a joint venture between Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (suplementado hasta 2000)); Harlow et al., (Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Paul [Ed.]); Fundamental Immunology, (Lippincott Williams & Wilkins (1998)); y Harlow, et al., (Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

- 55 En otra realización, la presente divulgación también se refiere al uso de inmunoensayos cuantitativos para medir los niveles de la proteína MN en muestras de pacientes. Se adaptan muchos formatos para usar con los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, la detección y cuantificación de la proteína MN en muestras de pacientes se pueden realizar mediante ensayos de inmunosorción ligados a enzimas, radioinmunoensayos, ensayos de tipo sándwich de anticuerpo dual, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, microscopia de inmunolectrones y de barrido, entre otros ensayos conocidos habitualmente en la técnica. En una realización, se

pueden detectar y cuantificar varios cambios en los niveles de proteína MN circulante y mediante un ensayo de tipo sándwich en el que el anticuerpo de captura se ha inmovilizado usando técnicas convencionales sobre la superficie del soporte.

5 Soportes adecuados incluyen, por ejemplo, soportes de polímero sintético, tales como polipropileno, poliestireno, poliestireno sustituido, poli(acrilamidas (tales como poliamidas y poli(cloruro de vinilo)), perlas de vidrio, agarosa y nitrocelulosa.

Un ejemplo de un inmunoensayo de tipo sándwich ELISA que se puede usar en los procedimientos de la presente invención usa anticuerpo monoclonal contra MNN anti-humano de ratón como anticuerpo de captura y anticuerpo policlonal contra MN anti-humano de cabra biotinilado como anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de
10 captura se inmoviliza sobre pocillos de placas de microtitulación. Muestras de suero/plasma humano diluido o patrones de MN (proteína MN silvestre recombinante) se incuban en pocillos para permitir la unión del antígeno de MN mediante el anticuerpo monoclonal de captura. Después de lavar los pocillos, el antígeno de MN inmovilizado se expone a un anticuerpo detector biotinilado tras lo cual se vuelven a lavar los pocillos. Después se añade un conjugado de peroxidada de rábano-estreptavidina. Después de un lavado final se añade a los pocillos sustrato TMB
15 Blue para detectar la actividad peroxidada unida. La reacción se detiene mediante la adición de ácido sulfúrico 2,5N y la absorbancia se mide a 450 nm. La correlación de los valores de absorbancia de las muestras con los patrones de MN permite la determinación de un valor cuantitativo de MN en pg/ml de suero o plasma.

Los anticuerpos útiles para identificar proteínas de MN se pueden marcar mediante cualquier forma convencional. Un ejemplo de un marcador es la peroxidasa de rábano y un ejemplo de un procedimiento de marcaje de
20 anticuerpos es usando complejos de estreptavidina-biotina.

Según sea adecuado, los anticuerpos usados en los inmunoensayos de la presente invención que se usan como marcadores se pueden marcar de cualquier modo, directa o indirectamente, que tenga como resultado una señal que sea visible o se pueda hacer visible. Las sustancias marcadores detectables incluyen radionúclidos tales como ^3H , ^{125}I and ^{131}I ; agentes de fluorescencia tales como isotiocianato de fluoresceína y otros fluorocromos, fibroiliproteínas, ficoeritrina, quelatos de tierras raras, rojo texas, dansilo y rodamina; reactivos colorimétricos (cromógenos); materiales opacos a electrones, tales como oro coloidal; agentes de bioluminiscencia; agentes de quimioluminiscencia; pigmentos; enzimas tales como peroxidasa de rábano, fosfatasas alcalinas, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, acetilcolinesterasa, alfa-, beta-galactosidasa, entre otros; coenzimas; sustratos enzimáticos; cofactores enzimáticos; inhibidores de enzimas; subunidades de enzimas; iones metálicos; radicales libres; o cualquier otra sustancia inmunológicamente activa o inerte que proporcione un medio para detectar o medir la presencia o cantidad de inmunocomplejo formado. Ejemplos de combinaciones de sustratos enzimáticos son peroxidasa de rábano y tetrametilbencidina (TMB) y fosfatasas alcalinas y paranitrofenilfosfato (pNPP).

Otros sistemas de detección y cuantificación según la presente invención producen señales luminiscentes, bioluminiscentes (BL) o quimioluminiscentes (CL). En ensayos quimioluminiscentes (CL) o bioluminiscentes (BL), la
35 intensidad o la emisión lumínica total se mide y relaciona con la concentración del analito desconocido. La luz se puede medir cuantitativamente usando un luminómetro (tubo fotomultiplicador como detector) o dispositivo acoplado a carga, o cualitativamente por medio de fotografía o películas de rayos X. Las principales ventajas del uso de estos ensayos es su simplicidad y sensibilidad analítica, lo que permite la detección y/o cuantificación de cantidades muy pequeñas de analito.

Ejemplos de marcadores luminiscentes son ésteres de acridinio, sulfonil carboxamidas de acridinio, luminol, umbeliferona, derivados de isoluminol, fotoproteínas tales como aecuatorina, y luciferasas de luciérnagas, bacterias marinas Vargulla y Renilla. El luminol se puede usar opcionalmente con una molécula potenciadora tal como 4-yodofenol o ácido 4-hidroxicinámico. Normalmente se genera una señal CL mediante tratamiento con un oxidante en condiciones básicas.

Los sistemas de detección luminiscente adicionales son aquéllos en los que la señal (marcador detectable) se producen mediante reacción enzimática sobre un sustrato. Se han desarrollado esquemas de detección CL y BL para analizar los marcadores de fosfatasas alcalinas (AP), glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, peroxidasa de rábano (HRP) y xantina oxidasa, entre otros. AP y HRP son dos marcadores enzimáticos que se pueden cuantificar mediante una serie de reacciones CL y BL. Por ejemplo, las AP se pueden usar con un sustrato, tal como un sustrato 1,2-dioxetano arilfosfato de adamantilo (p. ej., AMPPD o CSPD; Kricka, L.J., "Chemiluminescence and Bioluminescence, Analysis by," Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (ed. R.A. Meyers) (VCH Publishers; N.Y., N.Y.; 1995)); por ejemplo, una sal disódica de 4-metoxi-4-(3-fosfatofenil) espiro [1,2-dioxetano-3,2'-adamantano], con o sin una molécula potenciadora tal como dicloruro de 1-(trioctilfosfonio metil)-4-(tributilfosfonio metil) benceno. La HRP se puede usar con sustratos tales como 2',3',6'-trifluorofenil-metoxi-10-metilacridan-9-carboxilato.

Las reacciones CL y BL se pueden adaptar para análisis, no solo de enzimas sino también de otros sustratos, cofactores, inhibidores, iones metálicos y similares. Por ejemplo, las reacciones de luminol, luciferasa de luciérnaga y luciferasa de bacterias marinas son reacciones indicadoras de la producción o consumo de peróxido, ATP y NADPH, respectivamente. Se pueden acoplar a otras reacciones con oxidasas, quinasas y deshidrogenasas, y se

pueden usar para medir cualquier componente de la reacción acoplada (enzima, sustrato, cofactor).

El marcador detectable puede estar unido directa o indirectamente a un anticuerpo usado en un ensayo de la presente invención. Ejemplos de unión indirecta del marcador detectable es el uso de un par de unión entre un anticuerpo y un marcador o el uso de un sistema de amplificación de señal.

- 5 Ejemplos de pares de unión que se pueden usar para unir anticuerpos a marcadores detectables son biotina/avidina, estreptavidina o antibiotina, avidina/anti-avidina; tiroxina/globulina de unión a tiroxina; antígeno/anticuerpo; anticuerpo/anti-anticuerpo; hidratos de carbono/lectinas; hapteno/anticuerpo anti-hapteno; pigmentos y moléculas hidrófobas/sitios de unión a proteínas hidrófobas; inhibidor enzimático, coenzima o cofactor/enzima; ácido polinucleico/secuencia de ácido polinucleico homóloga; fluoresceína/anti-fluoresceína; dinitrofenol/anti-dinitrofenol; vitamina B12/factor intrínseco; cortisona; cortisol/proteína de unión a cortisol; y ligandos para proteínas receptoras específicas/proteínas receptoras específicas asociadas a la membrana.

- 15 En la técnica se conocen varios medios para unir marcadores directa o indirectamente a anticuerpos. Por ejemplo, los marcadores se pueden unir de forma covalente o no covalente. Ejemplos de procedimientos de conjugación de anticuerpos se describen en Avarmeas, et al., Scan. J. Immunol. 8(Suppl. 7): 7, 1978); Bayer, et al., Meth. Enzymol. 62:308, 1979; Chandler, et al., J. Immunol. Meth. 53:187, 1982; Ekeke and Abuknesha, J. Steroid Biochem. 11:1579, 1979; Engvall and Perlmann, J. Immunol. 109:129, 1972; Geoghegan, et al., Immunol. Comm. 7:1, 1978; and Wilson and Nakane, Immunofluorescence and Related Technique Elsevier/North Holland Biomedical Press; Amsterdam (1978).

- 20 Dependiendo de la naturaleza del marcador se pueden usar varias técnicas para detectar y cuantificar el marcador. Para los agentes de fluorescencia se dispone de un gran número de fluorímetros. Para los agentes de quimioluminiscencia se dispone de luminómetros o películas. Con enzimas, un agente fluorescente, agente quimioluminiscente o producto coloreado se puede determinar o medir fluorimétricamente, luminométricamente, espectrofotométricamente o visualmente.

- 25 Varios tipos de compuestos quimioluminiscentes que tienen un tipo acridinio, benzacridinio o acridano de sistemas anulares heterocíclicos son otros ejemplos de marcadores. Ejemplos de ésteres de acridinio incluyen los compuestos que tienen anillos heterocíclicos o sistemas anulares que contienen el heteroátomo en un estado de oxidación positiva que incluye sistemas anulares como acridinio, benz[a]acridinio, benz[b]acridinio, benz[c]acridinio, un catión de bencimidazol, quinolinio, isoquinolinio, quilolizinio, un quinolinio sustituido cíclico, fenantridinio y quinoxalino.

- 30 El marcador se puede preparar uniendo al anticuerpo seleccionado directa o indirectamente un grupo funcional reactivo presente en el éster de acridinio o benzacridinio, como es bien conocido para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Weeks, et al., Clin. Chem. 29(8): 1474 - 1479, 1983). Ejemplos de compuestos son ésteres de acridinio o benzacridinio con un grupo saliente de anillo arilo y el grupo funcional reactivo presente en la posición para o meta del sistema de arilo. (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.745.181 y el documento WO 35 94/21823.)

Procedimientos de uso

- 40 El término "tratamiento" incluye cualquier procedimiento, acción, aplicación, terapia o similar, en el que a un sujeto (o paciente), incluido un ser humano, se le proporciona ayuda médica con el objeto de mejorar la afección del sujeto, directa o indirectamente, o ralentizar la progresión de una afección, o trastorno, en el sujeto, o aliviar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno en tratamiento.

- 45 El término "terapia de combinación" o "co-terapia" quiere decir la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una enfermedad, afección y/o trastorno. Dicha administración abarca la coadministración de dos o más agentes terapéuticos de un modo sustancialmente simultáneo, tal como en una única cápsula que tiene una proporción fija de ingredientes activos, o en múltiples cápsulas distintas para cada agente inhibidor. Además, dicha administración abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de forma secuencial. El orden de administración de dos o más agentes terapéuticos co-administrados de forma secuencia no está limitado.

- 50 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" quiere decir la cantidad de cada agente administrado que alcanzará el objetivo de mejora de la gravedad de una enfermedad, afección y/o trastorno, y/o sus síntomas, mientras que evita o minimiza los efectos secundarios adversos asociados con el tratamiento terapéutico administrado.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa que el artículo sujeto es adecuado para usar en un producto farmacéutico.

- 55 Cabe esperar que los anticuerpos de la presente invención sean valiosos como agentes terapéuticos. De acuerdo con esto, una forma de realización de la presente invención incluye un procedimiento de tratamiento de varias afecciones en un paciente (incluidos mamíferos), que comprende administrar a dicho paciente una composición que contiene una cantidad de un anticuerpo de la invención que es efectiva en el tratamiento de la afección diana.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en el tratamiento o prevención de enfermedades y/o comportamientos que están asociados con la proteína MN. Estas enfermedades y/o comportamientos incluyen, por ejemplo, cáncer, tal como carcinomas de riñón, esófago, mama, cuello uterino, colon y pulmones. La presente invención también se refiere a procedimientos de alivio de síntomas de un trastorno en el que la MN está elevada o, de otro modo, se expresa de forma anormal. Estos trastornos incluyen, sin limitación, carcinomas de riñón, esófago, mama, cuello uterino, colon y pulmones (véase, por ejemplo, (Liao, Cancer Res. 57:28272831, 1997; Turner, Hum. Pathol. 28:740744, 1997; Liao, y col., Am. J. Pathol. 145:598609, 1994; Saarnio, y col., Am. J. Pathol. 153:279285, 1998; Vermylen, y col., Eur. Respir. J. 14:806811, 1999). En una forma de realización de la invención, una dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención se administra a un paciente que tenga un trastorno en el que la MN está elevada.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La terapia de combinación incluye la administración de una única formulación de dosificación farmacéutica que contiene un anticuerpo de la presente invención y uno o más agentes terapéuticos, así como la administración del anticuerpo de la presente invención y cada agente terapéutico en su propia formulación de dosificación farmacéutica aparte. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención y un agente terapéutico se pueden administrar al paciente juntos en una única composición de dosificación oral o cada agente puede administrarse en formulaciones de dosificación oral separadas.

Cuando se usan formulaciones de dosificación distintas, el anticuerpo de la presente invención y uno o más agentes terapéuticos pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo (p. ej., de forma concurrente) o a tiempos separados escalonados (p. ej., secuencialmente). El orden de administración del agente no está limitado.

Por ejemplo, en un aspecto, la co-administración de un anticuerpo anti-MN o fragmento de anticuerpo de la invención junto con uno o más agentes anticancerosos para potenciar el efecto del anticuerpo/fragmento o el(los) agente(s) anticanceroso(s) o ambos se contempla para usar en el tratamiento de trastornos relacionados con la MN, tales como cáncer.

Dichas terapias de combinación también pueden usarse para prevenir el cáncer, la recurrencia del cáncer, prevenir la diseminación o metástasis de un cáncer o reducir o aliviar los síntomas asociados con el cáncer.

El o los agentes anti-cancerosos pueden incluir cualquier compuesto conocido y adecuado en la técnica, tal como, por ejemplo, agentes químicos, otros inmunoterapéuticos, vacunas contra cáncer, agentes anti-angiogénicos, citocinas, terapias hormonales, terapias génicas y radioterapias. Un agente químico (o "agente anti-canceroso" o "agente anti-tumoral o agente terapéutico contra el cáncer") se refiere a cualquier molécula o compuesto que ayuda en el tratamiento de un cáncer. Ejemplos de agentes químicos contemplados por la presente invención incluyen, entre otros, citosina arabinósido, taxoides (e.g., paclitaxel, docetaxel), agentes anti-tubulina (e.g., paclitaxel, docetaxel, epotilona B, o sus análogos), macrólidos (p. ej., rizoxina) cisplatino, carboplatino, adriamicina, tenopósido, mitozantrón, discodermolida, eleuterobina, 2- clorodesoxiadenosina, agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis- diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, tiotepa), antibióticos (p. ej., dactinomina (antes actinomina), bleomicina, mitramicina, antramina), antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, flavopiridol, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, dacarbazina, temozolamida), asparaginasa, bacilos de Calmette y de Guerin, toxina diftérica, hexametilmelamina, hidroxiaurea, LYSODREN.RTM., análogos nucleosídicos, alcaloides vegetales (p. ej., Taxol, paclitaxel, campotecina, topotecán, irinotecán (CAMPTOSAR, CPT-I I), vincristina, alcaloides de la vinca (tales como vinblastina), podofilotoxina (incluidos los derivados, tales como epipodofilotoxina, VP-16 (etopósido), VM-26 (tenipósido)), citocalasina B, colchicina, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, procarbazona, mecloretamina, antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (antes daunomicina), doxorubicina, doxorubicina liposómica), dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomina D, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puomicina, agentes antimetabólicos, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador del plasminógeno tisular, aldesleukina, alutamina, anastrozol, bicalutamida, biaomicina, busulfano, capecitabina, carboplatino, clorambucilo, cladribina, citarabina, dactinomina, estramustina, floxuridina, gemcitabina, goserelina, idarrubicina, ifosfamida, leuprolida acetato, levamisol, lomustina, mecloretamina, megestrol, acetato, mercaptopurina, mesna, mitolanc, pegaspergasa, pentostatina, picamieína, rituximab, campath-1, estreptozocina, tioguanina, tretinoína, vinorelbina, o cualquier fragmento, miembros de la familia o sus derivados, incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables. Las composiciones que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos (p. ej., FLAG, CHOP) también se contemplan en la presente invención. FLAG comprende fludarabina, citosina arabinósido (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona.

El agente quimioterapéutico puede ser un agente antiangiogénico, tal como, por ejemplo, angiostatina, bevacizumab (Avastin®), sorafenib (Nexavar®), baculostatina, canstatina, maspina, anticuerpos o péptidos anti-VEGF, anticuerpos o péptidos anti-factor de crecimiento placentario, anticuerpos anti-Flk- -1, anticuerpos o péptidos anti-Fit- -1, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de la metaloproteínasa tisular, interferones, interleucina 12, IP-10, Gro-β, trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CMI01, Marimastat, pentosán polisulfato, angiopoyetina 2, interferón-alfa, herbimicina

A, PNU145156E, fragmento 16K de prolactina, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM- -1470, factor plaquetario 4 o minociclina. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la coadministración de un agente antiangiogénico puede conducir, de forma ventajosa, al incremento de la expresión de MN en un tumor, de modo que hace que el tumor sea más sensible a los anticuerpos y conjugados de anticuerpos de la invención.

En un aspecto, dicho agente quimioterapéutico es gemcitabina a una dosis que varía de 100 a 1000 mg/m²/ciclo. En una forma de realización, dicho agente quimioterapéutico es dacarbazina a una dosis que varía de 200 a 4.000 mg/m²/ciclo. En otro aspecto, dicha dosis varía de 700 a 1000 mg/m²/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es fludarabina a una dosis que varía de 25 a 50 mg/m²/ciclo. En un aspecto, dicho agente quimioterapéutico es citosina arabinósido (Ara-C) a una dosis que varía de 200 a 2.000 mg/m²/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es docetaxel a una dosis que varía de 1,5 a 7,5 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es paclitaxel a una dosis que varía de 5 a 15 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es cisplatino a una dosis que varía de 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es 5-fluorouracilo a una dosis que varía de 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es doxorubicina a una dosis que varía de 2 a 8 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es epipodofilotoxina a una dosis que varía de 40 a 160 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es ciclofosfamida a una dosis que varía de 50 a 200 mg/kg/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es irinotecán a una dosis que varía de 50 a 150 mg/m²/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es vinblastina a una dosis que varía de 3,7 a 18,5 mg/m²/ciclo. En otro aspecto más, dicho agente quimioterapéutico es vincristina a una dosis que varía de 0,7 a 2 mg/m²/ciclo. En un aspecto, dicho agente quimioterapéutico es metotrexato a una dosis que varía de 3,3 a 1000 mg/m²/ciclo

En otro aspecto, los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpo de la presente invención se administran en combinación con uno o más agentes inmunoterapéuticos, tales como anticuerpos o inmunomoduladores, que incluyen, entre otros, Herceptin®, Retuxan®, OvaRex, Panorex, BEC2, IMC-C225, Vitaxin, Campath I/H, Smart MI95, LymphoCide, Smart I D 10 y Oncolym, rituxán, rituximab, gemtuzumab o trastuzumab.

La invención también contempla administrar los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpos de la presente invención con uno o más agentes anti-angiogénicos, que incluyen, entre otros, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, Serpin (inhibidor de la serínproteasa) anti-trombina, fragmentos proteolíticos de 29 kDa en N-terminal y de 40 kDa en C-terminal de fibronectina, fragmento proteolítico de 16 kDa de prolactina, fragmento proteolítico de 7,8 kDa del factor-4 plaquetario, un péptido β-aminoácido correspondiente a un fragmento del factor-4 plaquetario (Maione y col., 1990, Cancer Res. 51:2077), un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a un fragmento del colágeno I (Tolma y col., 1993, J. Cell Biol. 122:497), un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de la trombospondina I (Tolsma y col., 1993, J. Cell Biol. 122:497), un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de la SPARC (Sage y col., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329) o cualquier fragmento, miembros de la familia o derivados del mismo, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

También se han descrito otros péptidos que inhiben la angiogénesis y corresponden a fragmentos de laminina, fibronectina, procolágeno y EGF (Véase la revisión de Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales y los pentapéptidos cíclicos, que bloquean ciertas integrinas que se unen a proteínas RGD (es decir, que poseen el motivo peptídico Arg-Gly- Asp) tienen actividades anti-vascularización (Brooks y col., 1994, Science 264:569; Hammes y col., 1996, Nature Medicine 2:529). Además, la inhibición del receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa por antagonistas inhibe la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis (Min y col., 1996, Cancer Res. 56:242833; Crowley y col., 1993, Proc Natl Acad. Sci. USA 90:5021). En la presente invención también se contempla el uso de dichos agentes anti-angiogénicos.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se administran en combinación con un régimen de radiación.

Los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con una o más citocinas, que incluyen, entre otras, linfocinas, factor de necrosis tumoral, citocinas similares al factor de necrosis tumoral, linfoxina-α, linfoxina-β, interferón-β, macrófago, proteínas inflamatorias, factor estimulador de las colonias de granulocitos monocitos, interleucinas (incluidas, entre otras, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6, interleucina-12, interleucina-15, interleucina- -18), ligandos OX40, CD27, CD30, CD40 o CD 137, ligando Fas-Pas, 4- IBBL, proteína activadora de monocitos endoteliales o cualquier fragmento, miembros de la familia o sus derivados, incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con una vacuna contra el cáncer, ejemplos de las cuales incluyen, entre otras, células o tejidos antígenos, células o tejidos no antígenos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna con microorganismos vivos contra BCG, proteínas de linaje melanocítico (p. ej., gp100, MART-1/MelanA, TRP-I (gp75), tirosinasa, antígenos ampliamente compartidos asociados con tumores, incluidos los específicos de tumores (p. ej., BAGE, GAGE-I, GAGE-2, MAGE-I, MAGE-3, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p15), antígenos mutados que están asociados con tumores (β-catenina, MUM-I, CDK4), antígenos no melanoma (p. ej., HER-2/neu (carcinoma de mama o de ovario), papilomavirus humano 5 E6, E7 (carcinoma cervical), MUC- -1

(carcinoma de mama, de ovario y de páncreas). Para los antígenos tumorales humanos reconocidos por los linfocitos T, véase, generalmente, Robbins y Kawakami, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8:628. Las vacunas contra el cáncer pueden o no ser preparaciones purificadas.

5 En otra forma de realización más, los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se usan junto con un tratamiento hormonal. Los tratamientos terapéuticos hormonales comprenden agonistas hormonales, antagonistas hormonales (p. ej., flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON), antagonistas de la LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y procesamiento de hormonas, y esteroides (p. ej., dexametasona, retinoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progestinas), antigestágenos (p. ej., mifepristona, onapristona) y antiandrógenos (p. ej., acetato de ciproterona).

Los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con, por ejemplo coadministrarse con, un agente fenotípico anti-MDR (resistencia a múltiples fármacos).

15 Muchos cánceres humanos expresan de forma intrínseca o desarrollan espontáneamente resistencia a varias clases de fármacos anticancerosos al mismo tiempo, a pesar de que cada una de las clases farmacológicas tienen diferentes estructuras y mecanismos de acción. Este fenómeno, que se puede imitar en células de mamífero cultivadas, se denomina generalmente multiresistencia ("MDR", del inglés Multidrug Resistance) o el fenotipo de multiresistencia. El fenotipo MDR presenta obstáculos significativos a los tratamientos quimioterapéuticos con éxito para cáncer en pacientes humanos. La multiresistencia de los tumores malignos a agentes quimioterapéuticos es una causa mayoritaria del fallo del tratamiento (Wittes y col., Cancer Treat. Rep. 70:105 (1986); Bradley, G. y col., Biochim. Biophys. Acta 948:87 (1988); Griswald, D. P. y col., Cancer Treat. Rep. 65(S2):51 (1981); Osteen, R. T. (ed.), Cancer Manual, (1990)). Los tumores que inicialmente son sensibles a los agentes citotóxicos a menudo recurren o se convierten en refractarios a múltiples fármacos quimioterapéuticos (Riordan y col., Pharmacol. Ther. 28:51 (1985); Gottesman y col., Trends Pharmacol. Sci. 9:54 (1988); Moscow y col., J. Natl. Cancer Inst. 80:14 (1988); Croop, J. M. y col., J. Clin. Invest. 81:1303 (1988)). Las células o tejidos obtenidos de tumores y cultivados en presencia de un fármaco citotóxico seleccionado puede tener como resultado la resistencia cruzada a otros fármacos en dicha clase además de en otras clases de fármacos, incluidas, entre otros, las antraciclinas, alcaloides de vinca y epipodofilotoxinas (Riordan y col., Pharmacol. Ther. 28:51 (1985); Gottesman y col., J. Biol. Chem. 263:12163 (1988)). Por tanto, la resistencia adquirida a un único fármaco tiene como resultado una resistencia simultánea a un grupo diverso de fármacos que no están ni estructural ni funcionalmente relacionados. Dicha resistencia puede ser un problema para los tumores en forma sólida y en forma líquida (p. ej., cánceres de la sangre o de la linfa).

Un mecanismo mayoritario de multiresistencia en células de mamífero implica el incremento de la expresión del sistema de bomba de glicoproteínas de membrana plasmática de 170 kDa (Juranka y col., FASEB J 3:2583 (1989); Bradley, G. y col., Blochem. Biophys. Acta 948:87 (1988)). El gen que codifica este sistema de bomba, en ocasiones denominado un transportador de múltiples fármacos, se ha clonado en células humanas cultivadas y generalmente se denomina *mdr1*. Este gen se expresa en varias clases de tejidos normales, pero los sustratos fisiológicos transportados para el producto del gen *mdr1* en estos tejidos no se han descrito. El producto MDR1 es un miembro de la superfamilia de las proteínas transportadoras ABC, un grupo de proteínas que tiene función de exportación dependiente de energía.

40 El producto proteico del gen *mdr1*, generalmente conocido como glicoproteína P ("P-170", "P-gp"), es una proteína transmembrana plasmática de 170 kDa que constituye la bomba de eflujo dependiente de energía mencionada en lo que antecede. La expresión de P-gp sobre la superficie de la célula es suficiente para hacer que las células sean multiresistentes a fármacos citotóxicos, incluidos muchos agentes anticancerosos. La MDR mediada por la P-gp parece ser un componente clínico importante de la resistencia tumoral en tumores de diferentes tipos y la expresión del gen *mdr1* se correlaciona con la resistencia a la quimioterapia en diferentes tipos de cáncer.

45 La secuencia nucleotídica del gen *mdr1* (Gros, P. y col., Cell 47:371 (1986); Chen, C. y col., Cell 47:381 (1986)) indica que codifica un polipéptido similar o idéntico a la glicoproteína P y que estos son miembros de la clase altamente conservada de proteínas de membrana similares a los transportadores bacterianos e implicados en los procesos de transportes fisiológicos normales. El análisis de la secuencia del gen *mdr1* indica que la Pgp consta de 1280 aminoácidos distribuidos entre dos mitades homólogas (identidad del 43 %). Cada mitad de la molécula tiene seis dominios transmembrana hidrófobos y cada una tiene un sitio de unión a ATP dentro de los grandes bucles citoplasmáticos. Sólo aproximadamente el 8 % de la molécula es extracelular y el resto de carbohidrato (aproximadamente 30 kDa) está unido a los sitios en esta región.

55 Por tanto, se apreciará que las células de mamífero que tienen una "multiresistencia" o fenotipo de "multiresistencia por la capacidad para secuestrar, exportar o expeler una pluralidad de sustancias citotóxicas (p. ej., fármacos quimioterapéuticos) del medio intracelular. Las células pueden adquirir este fenotipo como resultado de la presión de selección impuesta por la exposición a un único fármaco quimioterapéutico (la toxina de selección). Como alternativa, las células pueden exhibir el fenotipo antes de la exposición a la toxina, ya que la exportación de sustancias citotóxicas puede implicar un mecanismo en común con la exportación normal de los productos de secreción celular, metabolitos y similares. La resistencia a múltiples fármacos difiere de la resistencia simple

60

- adquirida a la toxina de selección en que la célula adquiere competencia para exportar citotoxinas adicionales (otros fármacos quimioterapéuticos) a las que la célula no ha sido expuesta anteriormente. Por ejemplo, Mirski y col. (1987), 47 Cancer Res. 25942598, describen el aislamiento de una población celular resistente a múltiples fármacos cultivando la línea celular H69, derivada de un carcinoma humano de pulmón de células pequeñas, en presencia de adriamicina (doxorubicina) como toxina de selección. Se encontró que las células supervivientes resistían a los efectos citotóxicos de los análogos de antraciclina (p. ej., daunomicina, epirubicina, menogarilo y mitoxantrona), acivicina, etopósido, gramicidina D, colquicina y alcaloides derivados de Vinca (vincristina y vinblastina) así como adriamicina. Se pueden aplicar técnicas de cultivo de selección similares para generar poblaciones celulares adicionales resistentes a múltiples fármacos.
- De acuerdo con esto, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir adicionalmente compuestos que actúan para inhibir el fenotipo MDR y/o las condiciones asociadas con el fenotipo MDR. Dichos compuestos pueden incluir cualquier compuesto inhibidor de MDR conocido en la técnica, tales como anticuerpos específicos de componentes de MDR (p. ej., anticuerpos transportadores anti-MDR) o inhibidores de moléculas pequeñas de transportadores de MDR, incluidos, específicamente, tamoxifeno, verapamilo y ciclosporina A, que son agentes de los que se conoce que invierten o inhiben la multirresistencia. (Lavie y col. J. Biol. Chem. 271: 19530 - 10536, 1996). Dichos compuestos se pueden encontrar en las patentes de EE.UU. nº 5.773.280, 6.225.325 y 5.403.574. Dichos compuestos inhibidores de MDR se pueden co-administrar con los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de la invención con varios fines, incluidos, invertir el fenotipo de MDR tras la detección del fenotipo de MDR para ayudar o potenciar un tratamiento quimioterapéutico. El inhibidor de MDR, tal como, por ejemplo, tamoxifeno, verapamilo o ciclosporina A, puede usarse junto con los compuestos de la invención para ayudar en la detección del fenotipo de MDR. De acuerdo con este aspecto, un inhibidor de MDR puede potenciar la captación y la acumulación de un compuesto de la invención en una célula de cáncer MDR, ya que la capacidad del sistema de transporte de MDR en el transporte o "bombeo hacia fuera" del compuesto de contraste respecto al dominio del sustrato disminuiría en presencia de un inhibidor de CDR.
- En otra forma de realización más, los anticuerpos anti-MN y/o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se usan junto con un programa de terapia génica en el tratamiento del cáncer. La terapia génica con células recombinantes que secretan interleucina 2 se puede administrar en combinación con los anticuerpos de la invención para prevenir o tratar el cáncer, particularmente el cáncer de mama (véase, por ejemplo, Deshmukh y col., 2001, J. Neurosurg. 94:287).
- Para evaluar la capacidad de un anticuerpo concreto para ser terapéuticamente útil para tratar el cáncer, como ejemplo, el anticuerpo puede analizarse *in vivo* en un modelo de tumor xenoinjertado de ratón. Si se desea, los anticuerpos frente a MN se pueden convertir en anticuerpos IgG₁ antes de la evaluación terapéutica. Esta conversión se describe en el Ejemplos 5 y un ejemplo de un modelo terapéutico se detalla en el ejemplo 9. La actividad del anticuerpo puede también analizarse usando un ensayo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos tal como se describe en el ejemplo 12.
- La presente invención también proporciona procedimientos diagnósticos con los que se puede detectar MN en una muestra de pacientes o una muestra biológica. Dichos procedimientos diagnósticos se pueden usar para, por ejemplo, diagnosticar trastornos en los que la MN está elevada. Dichos trastornos incluyen, entre otros, carcinomas de riñón, esófago, mama, cuello uterino, colon y pulmones. Cuando se usa para diagnóstico, la detección de una cantidad del complejo anticuerpo-MN en una muestra de un paciente que es superior a una cantidad del complejo en una muestra normal identifica al paciente como que probablemente presente el trastorno. En el ejemplo 11 se describe un procedimiento inmunohistoquímico para la detección de MN en tejidos de cáncer.
- En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para detectar y/o visualizar un cáncer relacionado con MN que tiene una cantidad anormal de proteína MN expresada. Dichos procedimientos pueden comprender poner en contacto la célula cancerosa relacionada con la MN con un anticuerpo anti-MN o fragmento de la invención y realizar una imagen usando una modalidad de imagen médica, en la que el anticuerpo anti-MN o fragmento comprende un dominio capaz de ser detectado mediante la modalidad de imagen médica.
- Los procedimientos de detección de la presente invención también se pueden realizar *in vitro*. La célula o tejido canceroso puede proceder de cualquier fuente adecuada, tal como, por ejemplo, una biopsia o un cultivo celular o tisular. Procedimientos para obtener biopsias y mantener y/o propagar los tejidos y/o células extirpados serán bien conocidos para los expertos en la técnica. La detección *in vitro* de multirresistencia puede tener varias aplicaciones, tales como, por ejemplo, determinar si el cáncer de un sujeto concreto, antes, durante o después del tratamiento, ha desarrollado un fenotipo multifármaco.
- El tipo de modalidad de imagen usada para detectar los compuestos de la invención dependerá del dominio marcador concreto usado en los compuestos de la invención. Por ejemplo, si el dominio marcador comprende un quilato de gadolinio, normalmente se podría usar RMN para detectar el agente de contraste de la invención. Si se usa un quelato de radionúclido como dominio marcador, se podría usar un procedimiento de imagen nuclear (p. ej., PET). Si se usa un dominio marcador basado en fluorescencia se podría usar un sistema de imagen óptica, tal como, por ejemplo, un sistema FACS o microscopia de fluorescencia o un lector de placas automático de fluorescencia. Elegir una modalidad de imagen adecuada para usar en los procedimientos de detección *in vitro* de la

invención están completamente dentro de los conocimientos del experto en la técnica.

Además, un experto en la técnica determinará la cantidad de agente de contraste usado en los procedimientos de detección *in vitro* de la invención y puede depender del grado hasta el cual está presente el fenotipo MDR, por ejemplo el nivel de expresión del sistema de transporte de MDR (p. ej., la P-glucoproteína). El experto en la técnica puede determinar qué cantidad de los nuevos compuestos de imagen es suficiente para detectar un fenotipo de MDR sin experimentación indebida, es decir una cantidad detectablemente suficiente.

El tipo de modalidad de imagen usada no se limita a ningún tipo concreto y puede incluir, por ejemplo, RMN, imagen nuclear (p. ej., PET o SPECT), imagen óptica, imagen por sonoluminiscencia o imagen fotoacústica (ultrasonidos). El experto en la técnica apreciarán que el dominio marcador concreto de los compuestos de imagen de la invención deberían ser compatibles con la modalidad de imagen concreta usada.

En una realización preferida, los procedimientos de detección usan anticuerpos anti-MN o fragmentos de los mismos y marcadores adecuados que se pueden detectar mediante RM. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de la invención pueden comprender un dominio marcador que es un agente de contraste para RM, tal como, por ejemplo, un quelato o quelatos metálicos paramagnéticos o cualquiera de los descritos en el presente documento: El agente de contraste también puede comprender un dominio marcador de radionúclido para obtener imágenes o detectar mediante una modalidad de imagen nuclear, tal como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), por ejemplo un radionúclido tal como, por ejemplo, ¹⁹Au, ⁷²As, ¹⁴¹Ce, ⁶⁷Cu, ⁶⁰Cu, ⁵²Fe, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁵¹Gr, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁵¹Mn, ²⁰³Pb, ¹⁸⁸Re, ⁹⁷Ru, ⁴⁷Sc, ^{177m}Sn, ^{94m}Tc, ¹⁶⁷Tm, y ⁹⁰Y. El radionúclido se puede quelar mediante un quelante adecuado o mediante varios quelantes, tales como, por ejemplo, HYNIC, DRPA, EDTA, DOTA, TETA, DTPA y BAT. Las condiciones en las que un quelante coordinará un metal están descritas por, por ejemplo, Gansow et al., patentes de EE.UU. N° 4.831.175, 4.454.06 y 4.472.509. El ^{99m}Tc (Tecnecio-99m) es un radioisótopo particularmente atractivo para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, ya que generalmente está disponible en varios departamentos de medicina nuclear, no es caro, da dosis mínimas de radiación al paciente y posee propiedades de imagen nuclear ideales.

La muestra del paciente se puede poner en contacto con un anticuerpo de la invención y, después, se puede analizar la muestra del paciente para detectar la presencia de un complejo anticuerpo-MN. Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo puede comprender un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente, radioisotópico, quimioluminiscente o enzimático, tal como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa.

Opcionalmente, el anticuerpo se puede unir a un soporte sólido, que puede acomodar la automatización del ensayo. Los soportes sólidos adecuados incluyen, entre otros, portaobjetos de vidrio o de plástico, placas de cultivo tisular, pocillos de microtitulación, placas de silicio o partículas tales como perlas (incluidas, entre otras, perlas de látex, poliestireno o vidrio). Cualquier procedimiento conocido en la técnica se puede usar para fijar el anticuerpo al soporte sólido, incluido el uso de enlaces covalentes y no covalentes, absorción pasiva, o pares de restos de unión unidos al anticuerpo y al soporte sólido. La unión de MN y el anticuerpo se puede conseguir en cualquier vaso adecuado para poner en contacto los reactantes. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrifuga.

Composiciones y dosificaciones farmacéuticas

Los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden proporcionar en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser no pirogénico. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico estéril, biocompatible, incluidos, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Se pueden emplear una variedad de vehículos acuosos, incluidos, entre otros, solución salina, glicina o similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de material particulada. Éstas soluciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas (p. ej., filtración).

Generalmente, la frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica e incluye un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administrar a mamíferos compuestos de la presente invención. Los vehículos incluyen cargas líquidas o sólidas, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicados en el transporte del agente sujeto de un órgano, una porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañinos para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; goma tragacanto en polvo; malta, gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; y otras sustancias

compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas.

Agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones de anticuerpo de la invención.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: Antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metasulfito sódico, sulfito sódico y similares; antioxidantes solubles en aceite, tal como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, y similares. La concentración del anticuerpo de la invención en dicha formulación farmacéutica puede variar considerablemente y puede seleccionarse principalmente sobre la base de volúmenes de fluido, viscosidades etc., de acuerdo con el modo de administración concreto seleccionado. Si se desea, más de un tipo de anticuerpo puede incluirse en una composición farmacéutica (p. ej., un anticuerpo con diferentes K_d para la unión a la MN).

Las composiciones pueden administrarse a un paciente solas o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier serie de vías, incluidas, entre otras, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, parenteral, tópica, sublingual o rectal.

Las composiciones de la invención adicionalmente contemplan inmunovehículos adecuados, tales como proteínas, polipéptidos o péptidos tales como albúmina, hemocianina, tiroglobulina y sus derivados, particularmente seroalbúmina bovina (BSA) y hemocianina de lapa californiana (KLH), polisacáridos, hidratos de carbono, polímeros y fase sólidas. Otras sustancias derivadas de proteínas o no derivadas de proteínas son conocidas para los expertos en la técnica.

En aspectos que implican vacunas, por ejemplo vacunas contra el cáncer junto con los anticuerpos de la invención, las composiciones de la invención se pueden administrar con o sin un adyuvante. La administración se puede llevar a cabo en ausencia de un adyuvante con el fin de evitar cualquier toxicidad inducida por adyuvante. El experto en la técnica a la que atañe la presencia invención, por ejemplo un médico especializado en cáncer, apreciará y entenderá cómo determinar si se debe usar o no un adyuvante y puede depender de la historia médica del un sujeto, los datos familiares, los datos de toxicidad, los resultados de las pruebas relacionadas con alergia etc. En formas de realización en los que se usa un adyuvante, es ventajoso que el adyuvante estimule la formación de anticuerpos protectores, tales como anticuerpos IgG protectores. Cualquier adyuvante adecuado conocido para un experto en la técnica se contempla en la presente invención y se adapta fácilmente a la presente invención. Adyuvantes adecuados para usar en la vacunación de animales pueden incluir, entre otros, hidróxido de aluminio, saponina y su componente purificado Quil A, adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF). Se ha mostrado que el sulfato de dextrano es un potente estimulador de anticuerpos IgG2 contra los antígenos de superficie celular estafilocócicos y también es adecuado como adyuvante. El experto en la técnica apreciará que algunos adyuvantes pueden ser más preferibles para aplicación veterinaria, mientras que otros adyuvantes serán preferibles para usar en seres humanos y que las toxicidades del adyuvante son una consideración que el experto en la técnica debe tener en cuenta antes de la administración del compuesto a un ser humano.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular y similares; vehículos farmacéuticos adecuados; y técnicas para la formulación y la administración se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., Vigésima edición, 2000). Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyente inerte de uso habitual en la técnica, tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular aceites de algodón, aceite de cacahuete, de maíz, de germen de trigo, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en la presente memoria descriptiva, significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitaciones, la inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal y la infusión.

La determinación de una dosis terapéuticamente efectiva está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de un anticuerpo que puede usarse para tratar de forma efectiva una enfermedad (p. ej., cáncer) en comparación con la eficacia que es evidente en ausencia de la dosis terapéuticamente efectiva.

- 5 La dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente en modelos de animales (p. j., ratas, ratones, conejos, perros o cerdos). El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

- 10 La eficacia terapéutica y la toxicidad (p. ej., DE_{50} , la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población y la DL_{50} , la dosis letal para el 50 % de la población) de un anticuerpo se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales. El cociente entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse en forma del cociente DL_{50}/DE_{50} . Los datos obtenidos de los estudios animales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en dichas composiciones puede estar dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

- 20 El médico puede determinar la dosificación exacta a la luz de los factores relacionados con el paciente que requiere el tratamiento. La dosificación y la administración pueden ajustarse para proporcionar niveles suficientes del anticuerpo o para mantener el efecto deseado. Entre los factores que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, la(s) combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento.

- 25 Los polinucleótidos que codifican anticuerpos de la invención se pueden construir e introducir en una célula, bien *ex vivo* o *in vivo*, usando técnicas bien establecidas incluidas, entre otras, transferencia de ADN mediada por transferrina-policaciones, fusión celular, transporte intracelular de perlas de látex recubiertas con ADN, fusión de protoplastos, infección vírica, electroporación, "disparo génico" y DEAE, o transfección mediada por fosfato cálcico.

Dosificaciones efectivas *in vivo* de un anticuerpo están en el intervalo de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del peso corporal del paciente. Para administración de polinucleótidos que codifican los anticuerpos, dosis *in vivo* eficaces están en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 500 μg de ADN.

- 30 El modo de administración de las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier vía adecuada que libere el anticuerpo en el huésped. Como ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles para administración parenteral (p. ej., administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o intranasal).

Ejemplos

35 Ejemplo 1: Construcción de biblioteca de Fab combinatoria humana (HuCAL Gold)

- La HuCAL[®] GOLD es una biblioteca de anticuerpos basada en tecnología HuCAL[®] (Human Combinatorial Antibody Library; MorphoSys AG, Martinsried/Planegg, Alemania). La biblioteca combina una biblioteca de anticuerpos sintéticos completamente humanos en el formato de Fab con seis regiones CDR diversificadas con una tecnología de expresión para la selección de anticuerpos de alta afinidad, CysDisplay[™] (MorphoSys AG, Martinsried/Planegg, Alemania). CysDisplay[™] es una tecnología de expresión en fagos monovalente basada en una unión fenotipo-genotipo mediante enlaces disulfuro que permite la recuperación de anticuerpos específicos con afinidades altas.

- 45 El vector de expresión en fagos pMORPH[®]23 es un vector fagémido que permite CysDisplay[™] monovalente de fragmentos Fab. Codifica el gIIIp de longitud total, la cadena Fd (V_H-C_H1), y la cadena ligera (V_L-C_L), todo lo cual está equipado con diferentes secuencias señal secretoras que dirigen la correspondiente cadena proteica al periplasma de *E. coli*. Las secuencias señal ompA y phoA se usan para transportar las cadenas pesada y ligera al periplasma, donde las cadenas se unen mediante interacciones no covalentes. Este vector de expresión porta una región promotor/operador de lac inducible. El producto del gen $laqI^q$ para la represión de la expresión se suministra mediante la cepa huésped de *E. coli* TG1. La inducción de expresión de Cys-gIIIp y Fab se consigue mediante la adición de IPTG (isopropil- β -D-tio-galacto-piranosido). Los conjuntos de Fab enriquecidos se subclonaron de pMORPH[®]23 en el vector de expresión de Fab pMORPH[®]x9 usando las enzimas de restricción XbaI y EcoRI. Mediante esta etapa, la cisteína y la parte ligador-His6 en el extremo C de la cadena Fd se retiraron y se escinde gIIIp. El vector de expresión pMORPH[®]x9_Fab_FH proporciona dos marcas en C-terminal, FLAG y 6xHis, de modo que se facilita la detección y purificación de las proteínas Fab.

Rescate de fagémidos y amplificación de fagos

- 55 Los fagémidos de Fab HuCAL GOLD en células TG1 se amplificaron en medio 2xTY suplementado con 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol y 1% de glucosa. Después de la infección en fagos colaboradores (VCSM13 ~2 - 6×10^{11} ufp/ml) a 37 °C

durante 30 minutos, las células TG se concentraron mediante centrifugación. El fago se amplificó mediante incubación de las células TG1 infectadas a 22 °C durante la noche en medio 2xTY que contiene 34 µg/ml de cloranfenicol, 50 µg/ml de kanamicina e IPTG 0,25 Mm. El sobrenadante que contiene fago se usó para el *panning* por fases.

5 **Ejemplo 2: *Panning* en fase sólida**

El *panning* en fase sólida se llevó a cabo revistiendo placas MaxiSorp™ (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) o Dynabeads™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) con proteína MN humana en PBS (1 µg/pocillo o 1 µg/1 mg de perlas). La proteína MN representa todo el dominio extracelular de la proteína con una cola de his en C-terminal para purificar. La proteína MN se expresó en una línea celular de mamíferos HKB-11 y se purificó mediante cromatografía Ni-NTA usando procedimientos estándar que son bien conocidos en la técnica. Los pocillos que contienen proteína MN unida se bloquearon con 5% de leche en PBS, se lavaron en PBS seguido de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente con un alícuota de la biblioteca de fagos HuCAL GOLD prebloqueada que contiene 1×10^{12} de fagos Fab HuCAL GOLD. El fago unido se lavó y después se eluyó con DTT 20 mM en tampón Tris 10 mM a pH 8,0. Se realizaron tres rondas de *panning* con amplificación en fagos entre cada ronda como se ha descrito anteriormente. La rigurosidad del lavado se aumentó entre cada ronda de *panning* para disminuir la unión inespecífica.

15 **Ejemplo 3: Subclonación de fragmentos Fab seleccionados para expresión en E.coli**

Los Fab seleccionados se clonaron del vector de expresión pMORPH®23 al vector de expresión pMORPH®x9_Fab_FH para facilitar la expresión rápida de Fab soluble para detección selectiva con ELISA. La preparación de ADN del vector pMORPH®23 se digirió con EcoRI y XbaI, de modo que se cortó todo el fragmento que codifica el Fab (ompA-VL-VL y phoA-Fd). Después de la purificación posterior, el fragmento se ligó en el vector pMORPHx9_Fab_FH preparado (también digerido con EcoRI/XbaI y purificado). El vector que contiene el inserto Fab se transfirió en células *E.coli* TG1 F competentes mediante electroporación. Las células *E.coli* transformadas se cultivaron en placas LB que contienen 34 µg/ml de cloranfenicol y 1% de glucosa o/n a 37 °C. Se escogieron las colonias y se colocaron en medios de cultivo que contenían 34 µg/ml de cloranfenicol y 1% de glucosa. Se añadió glicerol hasta un 20% y estos cultivos iniciadores de reserva se almacenaron a -80 °C hasta que se necesitaron para el ELISA. Para obtener Fab purificados, los transformantes de *E.coli* portadores de este vector se cultivaron habitualmente en múltiples matraces de agitación de 1 l, se recogieron y se purificaron usando cromatografía de afinidad de Ni-NTA usando procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica.

30 **Ejemplo 4: Identificación de fragmentos Fab de unión a MN mediante ELISA**

Placas de ELISA de 96 pocillos Maxisorp se revistieron con 100 µl/pocillo de una solución de proteína MN humana purificada a una concentración de 5 µg/ml en PBS. Los Fab se expresaron usando transformantes de *E.coli* cultivados en medio 2xTY que contiene 34 µg/ml de cloranfenicol de cultivos de reserva iniciados. Doce (12) horas antes de la recolección, la expresión de Fab se indujo mediante la adición de IPTG (concentración final 0,5 mM) Las células se lisaron y 100 µl de lisado se incubaron dentro del pocillo de una placa Maxisorp bloqueada con leche y prerrecubierta con MN durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron en TBS y TBS que contenía Tween para eliminar la unión inespecífica. Los Fab unidos se detectaron con un anticuerpo (Fab')₂ anti-humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce Chemical, Rockford, IL). El sustrato AttoPhos (Roche Diagnostics, Alameda, CA) se usó como se indica en las instrucciones de los fabricantes, la excitación a 430 nm y la emisión se leyó a 535 nm.

Un gran número de transformantes de *E.coli* expresaron Fab que exhibieron una proporción señal-ruido en el ELISA de > 10. La secuenciación de ADN de las regiones VH y VL identificaron más de 50 Fab de unión a MN únicos. Las secuencias de ADN y de proteína de todas las VH y VL de diez anticuerpos en base a sus propiedades funcionales se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente. Cada uno de estos anticuerpos divulgados unidos mediante ELISA a la proteína MN purificada aislada de una línea celular de expresión en mamífero, HKB-11 (Figura 5). Los anticuerpos estudiados también reaccionaron con MN purificada aislada de células de insecto sf9 que se habían infectado con un baculovirus que codifica el dominio extracelular de MN (Figura 5), que demuestra que las interacciones del ELISA eran específicas de la proteína MN y no cualquier contaminante marcador en las preparaciones proteicas. En un ensayo BIAcore™, los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente a MN humana con una Kd en el intervalo de 1 nM (1×10^{-9} M) a aproximadamente 50 nM ($5,0 \times 10^{-8}$ nM) (Figura 5).

50 **Ejemplo 5: Identificación de Fab e IgG de unión a MN**

Las interacciones de unión entre la proteína MN y los anticuerpos de la presente invención se analizaron usando tecnología de resonancia en plasmón superficial en un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Uppsala, Suecia). Para la unión de IgG de longitud completa (1e4, 1aa1, and 3ee9), el Fc de IgG anti-humana de cabra se acopló covalentemente el chip biosensor CM5 a una densidad alta usando un kit de acoplamiento de aminos estándar (BIAcore, Uppsala, Suecia). Después se usó un ensayo de captura usado para unir estas IgG a la superficie inmovilizada-Fc de IgG, dirigido a 300 unidades de respuesta de señal BIAcore. El BIAcore se realizó a 25 °C y a un caudal de 10 µl/min con un tampón de carrera que contiene PBS/0,05% de Tween 20, o que contiene Na-HEPES 10

mM, a pH 7,5/NaCl 150mM/EDTA 3mM /0,05% de Tween 20. Después de la unión del ligando, el caudal se aumentó a 25 μ l/min y se pasaron varias concentraciones del analito de MN (p. ej., un intervalo de 50 nM a 1 nM) sobre la superficie durante 10 minutos de un modo tal que se pudo monitorizar la fase de asociación. Después, procedió la disociación durante 35 minutos, seguida de regeneración de la superficie inmovilizada-Fc de IgG anti-humana a 100 μ l/min con 100 μ l de ácido fosfórico 10 mM. Los sensogramas se adaptaron usando un modelo de unión Langmuir a 1:1 para calcular las constantes de velocidad. La unión de Fab a MN se determinó de un modo similar a excepción de que una IgG Fab-antihumana se inmovilizó sobre el chip y se usó para capturar los Fab antes de la evaluación de la unión a MN. La Figura 5 muestra las constantes de unión resultantes para la unión de los anticuerpos divulgados a la proteína MN purificada. Cada uno de los anticuerpos se unieron a MN exhibiendo valores de Kd comprendidos entre 0,15 y 50 nM.

Ejemplo 6: Construcción de vectores de expresión de inmunoglobulina HuCAL para la expresión transitoria de anticuerpos en células 293F.

Vector de expresión de cadena pesada. Se eliminó el sitio de clonación múltiple de pcDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se insertó un sitio compatible con los sitios de restricción lisados para HuCAL para la unión de las secuencias líder (NheI/EcoRI, dominios en VH) (EcoRI/B1pl), y las regiones constantes de la inmunoglobulina (B1pl/ApaI). La secuencia líder (EMBL M83133) estaba equipada con una secuencia Kozak (Kozak, Nucleic Acid Res. 15:8125 - 8148,1987). Las regiones constantes de IgG1 humana (PIR J00228), IgG4 (EMBL K01316) y Gal sérica (EMBL J00220) se diseccionaron en oligonucleótidos solapantes con longitudes de aproximadamente 70 bases. Se introdujeron mutaciones silenciosas para eliminar los sitios de restricción no compatibles con el diseño HuCAL. Los oligonucleótidos se sometieron a corte y empalme mediante PCR de extensión de solapamiento.

Vectores de expresión de cadena ligera. El sitio de clonación múltiple de pcDNA3.1/Zeo+ (Invitrogen, Carlsbad, CA) se sustituyó por dos sitios diferentes. El sitio κ proporcionó sitios de restricción para la inserción de una κ -líder (NheI/EcoRV), HuCAL-scFv dominios de V κ (EcoRV/BsiWI,) y la región constante de la cadena κ (BsiWI/ApaI). Los correspondientes sitios de restricción en el sitio λ fueron NheI/EcoRV (I-líder), EcoRV/HpaI dominios de V λ (I) y HpaI/ApaI (región constante de la cadena λ). La líder κ (EMBL Z00022) así como la líder λ (EMBL L27692) estaban ambas equipadas con secuencias Kozak. Las regiones constantes de la cadena κ humana (EMBL J00241) y la cadena λ (EMBL M18645) se montaron mediante PCR de extensión con solapamiento como se ha descrito anteriormente.

Generación de IgG de longitud completa a partir de Fab. La secuencia de cadena pesada del Fab contenida dentro del vector de expresión de *E.coli* pMORPHx9_Fab_FH se escindió cortando con MfeI/B1pl y ligando en el vector de expresión de cadena pesada descrito anteriormente que se había cortado con EcoRI/B1pl. La secuencia de cadena ligera kappa del Fab contenida dentro de pMORPHx9_Fab_FH se escindió cortando con EcoRV/BsiWI y ligando en el vector de expresión de la cadena ligera kappa descrito anteriormente que también se había cortado con EcoRV/BsiWI. La secuencia de la cadena ligera lambda del Fab contenida dentro de pMORPHx9_Fab_FH se escindió cortando con EcoRV/HpaI y ligando en el vector de expresión de la cadena ligera lambda descrito anteriormente.

Expresión transitoria de IgG de longitud completa a gran escala. Se sembraron Cellbag 20L/0 (Wave Biotech LLC, Somerset, NJ) con $0,25 \times 10^6$ de células 293F/ml (Invitrogen) en el medio de expresión 9.3 L Freestyle 293 (Invitrogen). Las células se cultivaron hasta una densidad de 1×10^6 /ml y se transfectoron mediante la adición de 5 mg de cada uno de el vector de expresión de cadena ligera y el vector de expresión de cadena pesada que codifica el anticuerpo de longitud completa en 350 ml de Optimem (Invitrogen) que contiene el reactivo 293fectina (Invitrogen). Tras la fermentación durante 96 horas a 37 °C, se recogió el sobrenadante del cultivo celular mediante centrifugación, se filtró en esterilidad, se concentró mediante filtración en flujo tangencial ajustada hasta un pH de 7,6 y después se sometió a cromatografía en columna estándar con proteína A (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Ejemplo 7: Ensayo de adhesión celular

Cincuenta (50) μ l de una solución 1 μ g/ml de MN purificada en PBS se adsorbieron en una placa de 96 pocillos no tratada durante la noche a 4 °C. La solución se eliminó y las células se aclararon 3 veces con PBS. Los pocillos se bloquearon durante 1 hora con 200 μ l de FBS al 50% en medio RPMI1640. Después, se trataron los pocillos con 100 μ g del anticuerpo anti-MN 1×10^4 en BSA al 1% en PBS, IgG control en BSA al 1% en PBS o BSA al 1% en PBS. Después de lavar con PBS, a los pocillos se añadieron 5.000 células MaTu (células MN+) y la placa se incubó durante la noche a 37 °C a 5% de CO₂. La capacidad de los anticuerpos anti-MN para bloquear la adhesión de las células MaTu a los pocillos revestidos con MN se evaluó después de lavar con PBS. Un ejemplo de este experimento se muestra en la Figura 6, en la que 100 μ g del anticuerpo anti-MN 1×10^4 inhiben la adhesión celular, mientras que la IgG control o el vehículo tampoco no.

Ejemplo 8: Modelo de cáncer de xenoinjerto subcutáneo con inmunoc conjugado

Los anticuerpos anti-MN se conjugaron con pequeñas moléculas citotóxicas usando protocolos conocidos en la técnica (p.ej., Liu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618 - 8623,1996.). Las células MaTu de xenoinjerto de mama

humano se mantuvieron como cultivos adherentes en medio RPMI suplementado con 10% de FBS. En ratones Ncr atímicos (de 8-12 semanas de edad) se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho 5×10^6 células en 0,1 ml de matrigel al 80%/HBSS al 20%. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de ~ 180 mg (6 días) se inició el tratamiento. Anticuerpos monoclonales conjugados con moléculas pequeñas citotóxicas se administraron i.v. una vez cada cuatro días (C4Dx3) a una dosis de 10 mg/kg. Los ratones control se trataron con PBS o con un anticuerpo monoclonal sin conjugar. Se realizaron exploraciones diarias del estado de salud de cada animal. Cada grupo experimental estaba compuesto por 10 ratones y el volumen de dosis fue 0,1 ml/10 g de peso corporal. La longitud y la anchura de cada tumor se midió usando un compás electrónico 2-3 veces a la semana y se calcularon los pesos de los tumores (mg) en base a la fórmula de $[\text{longitud (mm)} \times \text{anchura ((mm)}^2)/2$. Se documentaron todos los datos, incluidas las observaciones diarias, obtenidos durante el curso del estudio. La inhibición del crecimiento tumoral (ICT) se calculó como $I-T/C \times 100$, donde T= pesos finales de los tumores de un grupo tratado y C= pesos finales de los tumores del grupo control. La Figura 7 muestra que la IgG1 monoclonal $1e4$ conjugada con un fármaco citotóxico producía un efecto antitumoral significativo a 30 mg/kg del inmunocombinado, mientras que el anticuerpo sin conjugar no tenía ningún efecto. Estos datos demuestran la utilidad terapéutica de los anticuerpos dirigida contra la proteína MN como vehículos para la liberación de fármaco en los tumores.

Ejemplo 9: Clasificación de células activadas por fluorescencia (ensayo FACS)

Se analizó la expresión de MN en las células como herramienta diagnóstica. Las células PC-3 mm2 que expresan MN y las células DLD1 que no expresan MN adheridas se desprendieron de sus matraces con 1:10 tripsina/Versene en solución de PBS durante de 5 a 10 minutos. Las células se centrifugaron (1.000 rpm, 5 minutos), se lavaron una vez con RPMI helado suplementado con 10% de FBS y se resuspendieron en tampón de tinción helado (PBS sin Ca^+ Mg^+ , 2% de BSA y 0,05% de azida sódica) a 6×10^6 células/ml. El anticuerpo primario, la IgG1 anti-MN humana o la IgG1 humana control a 25 $\mu\text{g/ml}$ se incubaron con 6×10^6 células en hielo durante 1 hora. El anticuerpo no unido se eliminó de las células mediante lavado con tampón de tinción helado. Las células se fijaron durante 10 minutos con formaldehído al 2 % en PBS, después se lavaron dos veces con tampón de tinción. El sedimento celular se resuspendió en 100 μl de tampón de tinción helado que contenía anticuerpo secundario Alexa fluor 488 anti-humano (concentración final 1:200, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubaron en hielo durante 1 hora. El anticuerpo no unido se eliminó de las células mediante lavado dos veces con tampón de flujo (PBS que contiene 2% de BSA) y las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de flujo. El análisis FACS de las células resuspendidas se realizó en un instrumento Beckman FACS Caliber. La Figura 8 muestra que las células de cáncer de próstata humano PC-3 mm2 expresaban MN según el análisis FACS, mientras que las células DLD-1 no lo hacían.

Ejemplo 10: Ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ensayos CCDA)

La actividad antitumoral de las IgG anti-MN puede estar mediada por actividad CCDA. Las células PC-3 mm2 que expresan MN y las células HCT-116 que no expresan MN se incuban con 250 ng/ml, 1.000 ng/ml o 2.000 ng/ml de anticuerpo IgG1 anti-MN humano o anticuerpo IgG1 humana control anti-digoxina. A estas células se añaden PBMC humanos a proporciones efector: diana de 50:1, 25:1, y 5:1. Se realiza un ensayo de liberación de cromo 51 para determinar el nivel de lisis celular diana. Se observa una cantidad pequeña de lisis tras la incubación del anticuerpo control o sin anticuerpo en presencia de células DLD y PC-3 mm2. Este nivel espontáneo de lisis es 10 - 15 %, 5 - 10 %, o 2 - 3 % para las proporciones efector:diana de 50:1, 25:1 y 5:1 respectivamente. De un modo similar, la lisis de células DLD que no expresan MN estaba en el intervalo de 0-10% cuando se incubaron con los anticuerpos anti-MN. No obstante, la lisis de células PC-3 mm2 cuando se incubaron con las IgG anti-MN humanas fue significativamente mayor que la de los controles. Se observó una lisis de 40, 50, and 60 % cuando se usan 250 ng/ml, 1.000 ng/ml y 2.000 ng/ml a proporciones efector:diana de 50:1. De un modo similar, se observó una lisis de 30, 33 y 38 % a proporciones de 25:1 y, por último, se observó una lisis de 8, 10 y 15 % a proporciones efector:diana de 5:1. Estos experimentos muestran que los anticuerpos anti-MN humanos median en la actividad de CCDA antitumoral y se pueden usar para el tratamiento terapéutico del cáncer.

Ejemplo 11. Inmunocombinado

Preparación

Se generó un anticuerpo humano dirigido al antígeno de superficie celular de MN usando una biblioteca de expresión en fagos que codifica una diversidad de Fab humanos (Morphosys). Este anticuerpo se conjugó con monometilauristatina E (MMAE) (Fransisco et al., Blood, 2003, 102:1458 - 1465) (Figura 9).

Actividad y selectividad *in vitro*

La porción de anticuerpo de 3ee9/MMAE (3ee9) se identificó mediante "panning" *in vitro* de un dominio extracelular de la MN humana contra la biblioteca de fagos MorphoSys compuesta por 10^{10} fragmentos Fab humanos (los Fab son las porciones de unión a antígeno de los anticuerpos). Los Fab activos se examinaron después para determinar su capacidad para unirse de forma selectiva y sufrir internalización tras la adición a células positivas para MN. Los Fab activos resultante se convirtieron en anticuerpos IgG1 humanos de longitud completa, se expresaron en células CHO, se purificaron y después se conjugaron con el toxóforo, MMAE (Liu et al, Proc Natl Acad Sci, 1996, 93:8618 - 8623). Los anticuerpos conjugados se analizaron después para determinar su capacidad para matar células que

expresan MN. De un panel de siete anticuerpos de longitud completa analizados, se seleccionó 3ee9/MMAE en base a sus propiedades de unión, selectividad y potencia en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Materiales y procedimientos de resonancia en plasmón superficial (Biacore)

5 Las interacciones de unión entre la proteína MN humana expresada en HKN11 y los AcMo anti-MN humanos de longitud completa se analizaron usando tecnología de resonancia en plasmón superficial en un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia). Para la preparación del chip, el Fc de IgG anti-humana de cabra se acopló covalentemente al chip biosensor CM5 usando el kit de acoplamiento de aminas estándar (Biacore, Uppsala, Suecia). Después se usó un ensayo de captura para unir estas IgG a la superficie inmovilizada-Fc de IgG, dirigido a 10 300 unidades de respuesta de señal Biacore. El Biacore se realizó a 25 °C y a un caudal de 10 µl/min con un tampón de carrera que contiene Na-HEPES 10 mM, a pH 7,5/NaCl 150mM/EDTA 3mM /0,05% de Tween 20. Después de la unión del ligando, el caudal se aumentó a 25 µl/min y se pasó el analito de MN (de 50 nM a 1 nM) sobre la superficie durante 10 minutos de un modo tal que se pudo monitorizar la fase de asociación. Después, procedió la disociación durante 35 minutos, seguida de regeneración de la superficie inmovilizada-Fc de IgG anti-humana a 100 µl/min con ácido fosfórico 10 mM. Los sensogramas se adaptaron usando un modelo de unión Langmuir a 1:1 para calcular las constantes de velocidad (Tabla 1, a continuación).

Tabla 1

Afinidad de anticuerpos derivados de <i>panning</i> por la MN soluble determinada mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)						
	1 E4	3EE9	1AA1	3A4	5AA3	3EF2
Afinidad (Kd, nM)	5	4	27	1	1	6

Unión del anticuerpo

20 Se demostró que 3ee9/MMAE tenía una kD de 3,6 nM para la proteína MN purificada usando tecnología Biacore, que era la misma que la afinidad del anticuerpo sin conjugar 3ee9. La unión a MN (CA IX) parecía específica, ya que no había unión detectable a 13 otras anhidrasas carbónicas. Se observó unión a CA5 asociada a mitocondrias, pero esta isozima sería inaccesible al anticuerpo *in vivo*.

25 Mediante análisis FACS se demostró que 3ee9/MMAE se unía a células MaTu que expresan MN, pero no a células DLD negativas para MN (Figura 10a). El anticuerpo contra MN G250 se usó un anticuerpo IgG1 humanizado (Wilex) como referencia en los estudios *in vitro*. Se unió a MN con una Kd de 5.3nM y exhibió un perfil de unión similar a las líneas celulares MN+ y MN- como 3ee9/MMAE.

Se obtuvieron resultados similares para el anticuerpo 1E4 y los inmunoconjugados 1aa1 (Figuras 10b y 10c, respectivamente), que exhibieron unión a células MN+, pero no a células MN-.

Internalización de anticuerpos

30 3ee9/MMAE se internalizó de forma selectiva mediante células que expresan MN (PC3mm2), pero no mediante células negativas para MN (DLD1), medido por Cellomics (Figura 11a). De un modo similar, se encontró que el inmunoconjugado 1E4 era internalizado por las células MN+ (PC3mm2), pero no por las células MN- (DLD1) (Figura 11b).

Inmunoprecipitación

35 Para explorar adicionalmente la especificidad se incubaron varios anticuerpos candidatos que incluyen la porción de anticuerpo de 3ee9/MMAE-(3ee9) y el anticuerpo de referencia G250 se incubaron con lisados celulares de líneas celulares MN+ (Pc3mm2) y MN- (DLD-1) que se habían marcado selectivamente con biotina. Los complejos entre los anticuerpos y las proteínas celulares se inmunoprecipitaron y los antígenos co-precipitados se visualizaron usando inmunotransferencias desarrolladas con estreptavidina unida a enzimas. Los anticuerpos G250 y 3ee9 de 40 3ee9/MMAE se unieron de forma selectiva y co-inmunoprecipitaron con una sola banda del mismo tamaño como MN de células MN+ (Figura 12). Anticuerpos menos específicos como 3ef2, 5aa3 y 5A6 co-inmunoprecipitaron otras varias proteínas además de MN.

Citotoxicidad

45 Se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Se encontró que 3ee9/MMAE era altamente citotóxico para las células PC3mm2 que expresan MN (CE₅₀= 50 nM), pero no para las células MIAPaca2 negativas para MN (Figura

13a). Se observó menos del 10% de muertes de células negativas para MN, incluso a dosis tan altas como de 1 uM. El inmunoconjugado 1A4 también se encontró que era citotóxico de forma selectiva para células MN+ (PC3mm2 y MaTu), pero no para células MN- (MIAPaca2 y DLD1) en los ensayos de citotoxicidad *in vitro* (Figura 13b). Adicionalmente, se encontró que el inmunoconjugado 1aa1 era citotóxico de forma selectiva para las células MN+ (PC3mm2), pero no por las células MN- (MIAPaca2) en los ensayos de citotoxicidad *in vitro* (Figura 13c).

El fármaco citotóxico MMAE liberado por 3ee9/MMAE es un inhibidor de tubulinas que impide la formación del huso durante la mitosis celular y tiene como resultado la parada en G2/M. El efecto del tratamiento de las células que expresan MN (Pc3mm2) y las células que no expresan MN (H460) con 3ee9/MMAE se muestra en la Figura 14. La tubulina se tiñe con anticuerpo marcado con fluorescencia. Las células no tratadas mostraron una formación normal del huso, mientras que las células que expresan MN tratadas mostraron fibras fragmentadas resultantes de la unión de tubulina con MMAE y la prevención de la formación del huso normal. No se observó actividad en las células que no expresan MN. Estos estudios confirmaron que el conjugado fármaco anticuerpo 3ee9/MMAE mata las células mediante alteración dirigida de la tubulina.

Ejemplo 12- Actividad *in vivo* del inmunoconjugado

Farmacología *in vivo* de 3ee9/MMAE contra ser humano con implante subcutáneo

Modelos de cáncer en xenoinjerto

3ee9/MMAE exhibe efectos antitumorales significativos y consistentes sobre el crecimiento de múltiples modelos tumorales en xenoinjerto humano en ratones atímicos cuando se administró por vía intravenosa según un programa intermitente. El efecto antitumoral *in vivo* de 3ee9/MMAE se analizó en 6 modelos de tumores en xenoinjerto humanos. Estos modelos se establecieron mediante implantación subcutánea de células tumorales humanas en ratones Ncr hembra atímicos (*nu/nu*) (Taconic, NY). Los modelos de xenoinjerto tumoral humano evaluados incluyeron el modelo de carcinoma de mama humano MaTu, modelos de carcinoma colorrectal (CCR) humano HT-29 y Colo-205, modelo de carcinoma humano PC3MM2, modelo de CCR resistente a múltiples fármacos HCT-15 (P-gp) y el modelo pancreático humano MiaPaCa2. Se usó PBS como vehículo y se prepararon soluciones de dosis a diario. El volumen de dosificación fue de 0,1 ml/10g (10 ml/kg).

La longitud y la anchura de cada tumor se midieron usando un compás electrónico 2-3 veces a la semana y se calcularon los pesos de los tumores (mg) en base a la fórmula de $[\text{longitud (mm)} \times \text{anchura ((mm)}^2)/2]$. Todos los datos, incluidas las observaciones diarias, obtenidos durante el curso del estudio se documentaron en el Sistema de Adquisición de Datos anti-tumoral (ADAS). La dosis máxima tolerada (DMT) se define como la dosis más alta que no produce más del 20% de letalidad y/p 20% de pérdida de peso corporal neta. La inhibición del crecimiento tumoral (ICT) se calculó como $(1-T/C \times 100)$, donde T= pesos finales de los tumores un grupo tratado después de la última dosis y C= pesos finales de los tumores del grupo control después de la última dosis. Además, la eficacia antitumoral se midió como la incidencia de respuestas (o respondedores o regresiones) definida como tumores con $\leq 50\%$ de su tamaño inicial. Se requiere una duración mínima de 7 días para que una respuesta se considere duradera.

Eficacia de 3ee9/MMAE en el modelo de xenoinjerto MaTu

Las células MaTu de xenoinjerto de mama humano se mantuvieron como cultivos adherentes en medio RPMI suplementado con 10% de FBS. En ratones Ncr atímicos (de 8-12 semanas de edad) se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho 5×10^6 células en 0,1 ml de matrigel al 80%/HBSS al 20%. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de ~ 180 mg (7 días) se inició el tratamiento. Se administró BAY 79 - 4620 (3ee9-IC) una vez cada cuatro días (C4Dx3) a una dosis de 1,3 y 10 mg/kg. Los ratones control se trataron con PBS o con un anticuerpo monoclonal sin conjugar a una dosis de 10 mg/kg.

Se realizaron exploraciones diarias del estado de salud de cada animal. Cada grupo experimental estaba compuesto por 10 ratones y el volumen de dosis fue 0,1 ml/10 g de peso corporal. La longitud y la anchura de cada tumor se midió usando un compás electrónico 2-3 veces a la semana y se calcularon los pesos de los tumores (mg) en base a la fórmula de $[\text{longitud (mm)} \times \text{anchura ((mm)}^2)/2]$. Se documentaron todos los datos, incluidas las observaciones diarias, obtenidos durante el curso del estudio. La inhibición del crecimiento tumoral (ICT) se calculó como $1-T/C \times 100$, donde T= pesos finales de los tumores de un grupo tratado y C= pesos finales de los tumores del grupo control.

3ee9/MMAE fue bien tolerada a todas las dosis analizadas con todos los animales tratados sin que exhibieran una pérdida significativa de peso. La eficacia representativa de 3ee9/MMAE en el modelo tumoral MaTu se ilustra en la Figura 15. Los tumores de grupos control sin tratar y tratados con vehículo crecieron de forma progresiva en todos los animales. El tiempo de duplicación medio para los animales de los grupos control y tratados con vehículo fue de 11,2 días. Al final de las dosis, 3ee9/MMAE mostró una eficacia antitumoral sólida a todas las dosis analizadas. Más específicamente, BAY 79-4620 (3ee9-IC) dio 67,72 y 78 % de ICT a 1, 3 y 10 mg/kg, respectivamente. En comparación, el AcMo 3ee9 no conjugado no tenía ningún efecto significativo en la inhibición del crecimiento de este tumor-xenoinjerto de mama.

Tras la finalización de la pauta de dosificación predeterminada (C4Dx3), se determinó el efecto de 3ee9/MMAE

sobre el retraso del crecimiento tumoral y la regresión. Como se muestra en la Figura 15, el tratamiento de 3ee9/MMAE tuvo como resultado un retraso significativo del crecimiento tumoral y regresión. A la menor dosis estudiada (1 mg/kg), tras el cese del tratamiento los tumores permanecieron estables durante -2 semanas y comenzaron a remitir después. En general, el 30% de los tumores respondieron a este tratamiento de 1 mg/kg. En comparación, el 100% de los animales respondió cuando fue expuesto a 3 y 10 mg/kg. Cabe destacar que incluso tras -3 meses tras el cese del tratamiento, solo 3 y 1 tumores mostraron signos de volver a crecer en los grupos tratados con 3 y 10 mg/kg, respectivamente, lo que muestra que el 70 y el 90% de los animales permaneció sin tumor incluso transcurridos 90 días desde el cese del tratamiento.

La IgG1 monoclonal 1E4 conjugada con un fármaco citotóxico producía un efecto antitumoral significativo contra el xenoinjerto de mama humano, MaTu, cuando se administró la dosis a 30 mg/kg del inmunocóncugado, mientras que el anticuerpo sin conjugar no tenía ningún efecto (Figura 16). Otros experimentos usando el mismo protocolo pero sustituyendo las formas conjugadas del anticuerpo 1aa1 (Figura 17), 3ee9 y 5aa3 dieron resultados similares. Adicionalmente, cuando se usa la forma conjugada de 3ee9, se observaron efectos antitumorales en otros modelos de xenoinjerto humano derivado de varios tipos histológicos, incluidos modelos de xenoinjerto de cáncer colorrectal humano HT-29 y Colo-205, y PC3-mm2, un modelo de xenoinjerto de próstata humana. Estos datos indican la utilidad terapéutica de los anticuerpos dirigidos contra la proteína MN como vehículos para la liberación de fármaco en los tumores.

Ejemplo 13. Determinación del índice terapéutico de 3ee9/MMAE en el modelo de xenoinjerto MaTu

La dosis máxima tolerada (DMT), la dosis mínima eficaz (DME) y el índice terapéutico (IT) de 3ee9/MMAE se determinó usando ratones portadores de tumor de xenoinjerto MaTu. El IT se define como la proporción de la DMT dividida por la DME. Se administró 3ee9/MMAE por vía intravenosa una vez cada cuatro días para un total de 2 inyecciones (C4Dx3)- Se administró 3ee9/MMAE a niveles de dosis de 0,625, 1,25, 2,5, 5,0, 10, 30 y 60mg/kg. Los ratones control se trataron con PBS o un anticuerpo monoclonal sin conjugar a una dosis de 60 mg/kg. 3ee9/MMAE a dosis de 60 mg/kg parecían ser la DMT, ya que se produjo una letalidad del 10% y una pérdida de peso corporal de ~20% en respuesta a este tratamiento. Los demás grupos de tratamiento fueron bien tolerados.

La actividad antitumoral de 3ee9/MMAE se presenta en la Figura 18. Al final de la dosificación, 3ee9/MMAE a una dosis de 0,625 y 1,24 mg/kg tuvo como resultado una inhibición del 62% y 81%, respectivamente. Dosis de 2,5, 5, 10, 30 y 60 mg/kg tuvieron como resultado una inhibición mayor del crecimiento tumoral (~90%), comenzando la mayoría de los tumores a mostrar regresiones. En base a los datos observados, la DME de 3ee9/MMAE fue 0,625mg/kg. Tras la finalización del régimen de dosificación predeterminado (C4Dx3), se determinó el efecto de 3ee9/MMAE sobre el retraso del crecimiento tumoral y la regresión. No se observó regresión tumoral para la dosis de 0,625 mg/kg. En contraste con esto, el 80% de los animales exhibió regresiones tumorales en respuesta a 1,25 mg/kg. Además, a dosis de 2,5 mg/kg y mayores el 100% de los animales respondió al tratamiento. Se determinó que el índice terapéutico de 3ee9/MMAE era -96.

Ejemplo 14. Eficacia de 3ee9/MMAE en el modelo de xenoinjerto HT-29

En ratones con CCR humano se inocularon células HT-29 por vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^6 células en 0,1 ml de HBSS. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de ~120 mg (5 días) se inició el tratamiento. 3ee9/MMAE se administró i.v. una vez cada cuatro días (C4Dx3) a una dosis de 0,625, 1,25, 2,5, 5,0, 10 mg/kg. Los ratones control se trataron con PBS o un anticuerpo monoclonal no conjugado a una dosis de 10 mg/kg. Además, MMAE se evaluó como un fármaco libre a una dosis de 0,1, 0,2 y 1 mg/kg. Las dosis de 0,1 y 0,2 mg/Kg de MMAE representan cantidades equivalentes de este fármaco a las presentes en 5 y 10 mg/Kg de 3ee9/MMAE respectivamente.

3ee9/MMAE fue bien tolerada a todas las dosis analizadas con todos los animales tratados sin que exhibieran una pérdida significativa de peso. De un modo similar, dosis menores de MMAE, es decir 0,1 y 0,2 mg/kg, fueron bien toleradas con una pérdida mínima y no significativa de peso. No obstante, a la dosis superior de 1 mg/kg se observó un 50% de letalidad exhibiendo el resto de animales una gran pérdida de peso y, por tanto, se consideró tóxica.

La eficacia representativa de 3ee9/MMAE y MMAE libre en el modelo tumoral HT-29 se ilustra en la Figura 19. Los tumores de grupos control sin tratar y tratados con vehículo crecieron de forma progresiva en todos los animales. El tiempo de duplicación medio para los animales de los grupos control y tratados con vehículo fue de 6,4 días. Al final de las dosis, 3ee9/MMAE mostró una eficacia antitumoral sólida a todas las dosis analizadas. Más específicamente, 3ee9/MMAE a dosis de 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/kg dio una ICT 54, 72, 97, 100 y 100%, respectivamente. En comparación, la MMAE libre de 0,2 mg/kg tuvo como resultado una ICT del 60%, mientras que 0,1 mg/kg no tenía un efecto significativo en la inhibición del crecimiento de este modelo de xenoinjerto. En términos de respuestas tumorales, dosis de 3ee9/MMAE de 1,25 mg/kg tuvieron como resultado regresiones en un 20% de los animales. A dosis mayores, las respuestas tumorales fueron mucho mayores, de modo que la dosis de 2,5 mg/kg muestra regresiones en el 90% y las dosis de 5 y 10 mg/kg inducen respuestas del 100%. Por el contrario, la MMAE libre no indujo ninguna respuesta tumoral como se ha definido anteriormente.

El efecto antitumoral de 3ee9/MMAE también se evaluó en programas variables, es decir una vez a la semana para

un total de dos dosis (C7Dx2, Figura 20) y una única dosis en el momento de la estadificación (CDx1, Figura 21). En ambos programas, se administraron dosis de 3ee9/MMAE de 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/kg. Con independencia del programa, 3ee9/MMAE fue altamente eficaz en la inhibición del crecimiento en este modelo de xenoinjerto de CCR.

5 La Tabla 2 siguiente resume la eficacia antitumoral de 3ee9/MMAE. La eficacia antitumoral fue muy similar a la que se observó para 3ee9/MMAE en el programa de C4Dx3, lo que indica que en los programas estudiados la eficacia antitumoral de 3ee9/MMAE parece ser independiente del programa.

Tabla 2

Eficacia antitumoral de 3ee9/MMAE				
Compuesto	Dosis (mg/kg)	Programa de tratamiento	%Inhibición (1-T/D)*100 (Día 18)	Porcentaje de regresiones
Control	N/A	N/A	N/A	0
PBS	0	C4D x 3	-17	0
Ac 3ee9	10	C4D x 3	-11	0
3EE9IC	0,625	C4D x 3	54	0
3EE9IC	1,25	C4D x 3	72	2
3EE9IC	2,5	C4D x 3	97	9
3EE9IC	5	C4D x 3	100	10
3EE9IC	10	C4D x 3	100	10
3EE9IC	0,625	C7D x 2	48	0
3EE9IC	1,25	C7D x 2	71	0
3EE9IC	2,5	C7D x 2	92	4
3EE9IC	5	C7D x 2	96	7
3EE9IC	10	C7D x 2	100	10
3EE9IC	0,625	C1D x 1	42	0
3EE9IC	1,25	C1D x 1	48	0
3EE9IC	2,5	C1D x 1	93	5
3EE9IC	5	C1D x 1	98	8
3EE9IC	10	C1D x 1	100	10
MMAE	1	C4D x 3	Tóxico	N/A
MMAE	0,1	C4D x 3	27	0
MMAE	0,2	C4D x 3	60	0

Ejemplo 15. Eficacia de 3ee9/MMAE en modelos de xenoinjerto PC3mm2 y Colo-205

La eficacia antitumoral de 3ee9/MMAE se evaluó después contra xenoinjertos tumorales de próstata humana (PC-3mm2) y CCR (Colo-205). En ratones hembra NCr *nulnu* se implantó por vía subcutánea (s.c.) 5×10^6 células PC3mm2 o Colo-205. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de aproximadamente 125-150 mg se inició el tratamiento. La salud general de los ratones se supervisó y registró a diario. Las dimensiones de los tumores y los pesos tumorales se registraron dos veces a la semana comenzando con el primer día de tratamiento.

En los estudios de PC3mm2 y Colo-205, 3ee9/MMAE se administró por vía intravenosa (i.v.) una vez cada 4 días para un total de 3 inyecciones (C4Dx3) a dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg y 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/kg, respectivamente. Como en otros estudios, 3ee9/MMAE fue bien tolerada a todas las dosis evaluadas. 3ee9/MMAE inhibió el crecimiento de tumores de próstata PC3MM2 establecidos cuando se administró a niveles de dosis de 10 y 30 mg/kg, mostrando el 100 % de los animales respuestas (Figura 22). A las dosis menores de 1 y 3 mg/kg, solo se observaron efectos moderados, dado que se observó una ICT de 45 a 50% al final de la dosificación. No obstante, el 20% de los animales sí mostró respuestas en el grupo de 3 mg/kg.

De un modo similar, en el modelo de xenoinjerto de CCR Colo-205, 3ee9/MMAE fue muy eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral (Figura 23). Al final de la dosificación se observó una ICT >90 % para dosis de 5 y 10 mg/kg y se observó una ICT >70 % en respuesta a la dosis de 2,5 mg/kg. La dosis más baja, 1 mg/kg, de 3ee9/MMAE fue relativamente ineficaz contra este modelo de CCR. En términos de regresiones, dosis de 3ee9/MMAE de 5 y 10 mg/kg tuvieron como resultado respuestas del 40 y 80%, respectivamente.

Ejemplo 16. Eficacia de 3ee9/MMAE en el modelo de xenoinjerto HCT-15

Para estudiar el efecto de 3ee9/MMAE en un modelo de resistencia a múltiples fármacos se implantó en ratones hembra NCr *nulnu* por vía subcutánea (s.c.) 5×10^6 células HCT-15. HCT-15 es una línea resistente a múltiples fármacos (MDR) que sobreexpresa la glicoproteína P (P-gp). Como tal, esta línea celular exhibe un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y es resistente a Taxol[®], doxorubicina y etopósido. 3ee9/MMAE, Taxol y Gemcitabina se administraron cuando los ratones tenían tumores establecidos con un peso medio de ~150 mg. La gemcitabina, un análogo pirimidínico que no es un sustrato de P-gp, se usó como control positivo. Como cabía esperar, la gemcitabina (120 mg/kg, i.p., CDx10) fue altamente activa en este modelo de MDR (Figura 24). Por el contrario, 3ee9/MMAE (siendo MMAE un sustrato conocido de P-gp) y Taxol[®] no pudo producir ningún efecto antitumoral significativo.

Ejemplo 17. Eficacia de 3ee9/MMAE en modelos de xenoinjerto huMN-MIAPaca2 y MIAPaca2

Para entender mejor la relación entre la expresión de MN y la eficacia antitumoral, se realizaron estudios de eficacia en xenoinjertos usando un modelo pancreático que expresa MN a niveles bajos, MIAPaCa2 y un modelo huMN-MIAPaCa2 que expresa niveles altos de MN. Esta última línea se obtuvo mediante ingeniería de la línea MIAPaCa2 para expresar de forma estable la MN. 3ee9/MMAE tuvo un efecto mínimo en la inhibición del crecimiento de esta línea MIAPaCa2 que expresa niveles bajos de MN (Figura 25). Dosis de 3ee9/MMAE de 10 mg/kg solo produjeron una ICT del 50%. Por el contrario, se observó una actividad antitumoral significativa para 3ee9/MMAE contra el modelo huMN-MIAPaCa2, donde, al final de la administración de las dosis, dosis de 2,5, 5 y 10 mg/kg dieron una ICT de 63, 82 y 94 %, respectivamente. Además, la dosis de 10 mg/kg indujo respuestas del 100%, lo que indica que hay un gran cambio de la sensibilidad al sobreexpresar niveles de MN en tumores.

Ejemplo 18. Combinación con Xeloda[®] en modelo de xenoinjerto Colo-205

Se investigó la viabilidad del uso de 3ee9/MMAE junto con otros agentes quimioterapéuticos para el cáncer. Xeloda[®] se usa como tratamiento de primera línea de pacientes con carcinoma colorrectal metastásico. Se evaluó la actividad y la tolerabilidad del tratamiento combinado usando 3ee9/MMAE y Xeloda[®]. 3ee9/MMAE se administró i.v. según un programa C4Dx3 y a niveles de dosis de 1,25, 2,5 y 10 mg/kg. Xeloda[®] se administró por vía oral una vez al día durante 9 días a niveles de dosis de 250 y 500 mg/kg. 3ee9/MMAE administrado solo a 2,5 y 10 mg/kg tuvo como resultado una inhibición sólida del crecimiento tumoral (ICT de 73 y 96 %, respectivamente) (Figura 26a). No obstante, el grupo tratado con 1,25 mg/kg de 3ee9/MMAE fue relativamente ineficaz, dando como resultado una ICT de solo el 31%. Xeloda[®] administrado solo a niveles de dosis de 250 y 500 mg/kg también produjo una ICT sólida del 78 y 86 %, respectivamente.

En términos de respuestas, el grupo tratado con 10 mg/kg de 3ee9/MMAE indujo una tasa de respuesta del 80%, mientras que el cero por ciento de los animales en ambos grupos de dosis de Xeloda[®] mostró regresiones. Todos los grupos de tratamiento de combinación fueron bien tolerados y tuvieron como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral, así como tasas de respuesta. Datos cuantitativos que detallan la ICT y las respuestas tumorales combinando estos dos agentes se muestran en las Figuras 26a y 26b, así como en la Tabla 3, más adelante. A las dosis estudiadas, la actividad antitumoral de 3ee9/MMAE combinada con Xeloda[®] fue muy superior a la de 3ee9/MMAE o Xeloda[®] administrados como agentes en monoterapia. Por último, con respecto a la tolerabilidad, la administración de estas sustancias terapéuticas fue bien tolerada sin reacciones adversas.

Tabla 3

Eficacia antitumoral de BAY 79-4620 (3ee9-IC) en combinación con Xeloda®					
Tratamiento	Programa	Dosis mg/kg/i nj	% de inhibición (T/C) (d 17)	% Pérdida de peso (d 17)	% de regresiones
Sin tratar	-	-	-	0.3	0
79-4620 (3ee9 cj)	C4DX3; i.v.	1.25	30.6	0.5	0
79-4620 (3ee9 cj)	C4DX3; i.v.	2.5	73	0.1	0
79-4620 (3ee9 cj)	C4DX3; i.v.	10	96.2	0.9	80
Xeloda	C1DX9; v.o.	250	78	-0.5	0
Xeloda	C1DX9; v.o.	500	86.1	-5.6	0
Xeloda (250 mg/kg)					
79-4620 (3ee9cj)+Xeloda	C4DX3; i.v./C1 DX9; v.o.	1.25	92.1	-2	50
79-4620 (3ee9 cj)+Xeloda	C4DX3; i.v./C1 DX9; v.o.	2.5	91.4	-0.9	60
79-4620 (3ee9 cj)+Xeloda	C4DX3; i.v./C1 DX9; v.o.	10	97.5	-0.4	100
Xeloda (500 mg/kg)					
79-4620 (3ee9 cj)+Xeloda	C4DX3; i.v./C1 DX9; v.o.	1.25	94.2	-0.3	70
79-4620 (3ee9 cj)+Xeloda	C4DX3; i.v./C1 DX9; v.o.	2.5	95.7	-3.2	90
79-4620 (3ee9 cj)+Xeloda	C4DX3; i.v./C1 DX9; v.o.	10	97.3	-1.4	100

Ejemplo 19. Distribución *in vivo*/Localización del tumor del AcMo 3ee9 contra el modelo de cáncer de xenoinjerto humano implantado bilateralmente.

- 5 Para determinar la distribución *in vivo* y la localización del tumor del componente AcMo de 3ee9/MMAE, se realizaron estudios de imagen no invasivos *in vivo* usando el CRI Maestro™ en ratones que recibieron implantación bilateral de tumores que exhiben una expresión tanto alta como baja de MN. El sistema de imagen *in vivo* Maestro™ (CRI, Woburn, MA) con adquisición y análisis de múltiples espectros se ha diseñado para eliminar la autofluorescencia de fondo. Los AcMo 3ee9 of BAY 79-4620, M75 (monoclonal de ratón que reconoce MN) y la IgG humana control se conjugaron con Alexa Fluor 750 (Invitrogen Cat# A20011) según las instrucciones de fabricante. La proporción Proteína/AF750(mol/mol) fue de 1/5,9 para 3ee9, 8,9 para la IgG humana y 6,0 para M75.

10 Doce días antes de la inyección de cada anticuerpo marcado con fluorescencia, en ratones Balb/C atímicos de Harlan se implantó MIAPaCa-2 (de baja expresión de MN; $7,5 \times 10^6$ células en 50% de Matrigel) por vía subcutánea en el flanco derecho y huMN-MIAPaCa2 (línea celular estable transfectada con MN; 5×10^6 células en 50% de Matrigel) por vía subcutánea en el flanco izquierdo. El día 0 (12 días después del implante) se inyectaron 4 µg del anticuerpo conjugado en cada animal. La imagen se tomó el día 4, el día 5 y el día 10. Los datos se recogieron usando animales anestesiados (100 mg/kg de ketamina / 10 mg/kg de xilazina, i.p.) y se colocaron dentro del

sistema de imagen. Se adquirieron cubos (serie de imágenes) de imagen de múltiples espectros espaciándose las imágenes cada 10 nm a lo largo del intervalo de espectros de 680 a 950 nm, que cubría la gama de infrarrojos cercanos (NIR).

5 Cada imagen se expuso durante 5 segundos. Las imágenes coloreadas falsas se sintetizaron del cubo de espectros usando software Maestro y se escalaron a un brillo visible usando ImagePro Plus 6.0. El escalado fue idéntico a todas las imágenes, siendo la imagen más brillante ligeramente por debajo del nivel de saturación. Los anticuerpos marcados de un modo más fluorescente tendían a localizarlo en el hígado y la vejiga. Tras de 4 a 5 días, la mayoría de la señal disminuye desde el hígado y la vejiga y se estabiliza en el tumor. Las imágenes tomadas el día 5 dieron la proporción señal-fondo más alta (Figura 27.) Tras cinco días, se había generado muy poca señal a partir de los animales a los que se inyectó hlgG, lo que indica que no se había podido localizar hlgG en el tejido tumoral. Por el contrario, tanto M75 como 3ee9 se localizaban específicamente en tumores de expresión de MN alta (huMN-MIAPaCa2). No se observó localización alguna en tumores MIAPaCa2 que expresan niveles bajos de MN en los mismos animales.

Ejemplo 20- Mecanismo de acción *in vivo*

15 Para explorar el mecanismo de acción *in vivo* de 3ee9/MMAE, se implantaron tumores por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones con 5×10^6 células HT-29. Ocho días después, se trató a ratones atímicos portadores de tumores HT-29 con vehículo o con 3ee9/MMAE a 1,25 y 5 mg/kg (CDx1). Los tumores se recogieron y se fijaron en formalina 4 horas y 1, 3 y 5 horas tras la administración de 3ee9/MMAE. Después, las muestras se incluyeron en parafina, se seccionaron a 5 μ m, se desparafinizaron y se tiñeron usando el protocolo estándar para inmunohistoquímica fluorescente de tejidos humanos usando anticuerpos de ratón: Anti- α / β -tubulina, Anti-fosfo-Histona H3 y ADN. Los cortes se observaron después con un microscopio de fluorescencia y se tomaron imágenes representativas a través de tres canales de colores diferentes.

25 3ee9/MMAE tuvo poco efecto en términos de afectar al mecanismo celular en las muestras de 4 h. No obstante, el día 1 había un número mayor de células en paro G2/M y claramente se observaron husos multipolares. Además, se pudo observar un nivel menor de tinción de tubulina. Estos efectos se amplificaron considerablemente en las muestras del día 3 y del día 5. De hecho, casi todas las células en el grupo de tratamiento con la dosis de 5 mg/kg de 3ee9/MMAE el día 5 estaban muy afectadas por el tratamiento (Figura 28). Estos datos indican claramente que 3ee9/MMAE afectaba al crecimiento de las células cancerosas mediante inhibición de tubulina, lo que conduce al cese de G2/M y apoptosis.

30 La Tabla 4 siguiente resume el perfil de comportamiento de 3ee9/MMAE.

Tabla 4

Perfil de 3ee9/MMAE	
Ensayo	Resultado para 3ee9/MMAE
Afinidad (Kd)	3,6 nM
Unión celular (FACS): MN+/MN-	+++/-
Internalización: MN+/MN-	+++/-
Citotoxicidad: MN+/MN- (ec50)	50 nM/>1 μ M
Inmunoprecipitación	específico
Ensayo	Resultado para 3ee9/MMAE
IHQ	específico
Distribución <i>in vivo</i>	normal
Actividad <i>in vivo</i> : MED	1 mg/kg
Actividad <i>in vivo</i> : MTD	60 mg/kg

Ejemplo 21. Construcción del vector de expresión, transfección, expresión y purificación de IgG anti-MN basado en las regiones variables-CDR de las cadenas ligera y pesada de 3ee9 usando un sistema de expresión celular CHO estable

Construcción del vector de expresión 3ee9_{H+L}pCMV_{UCOE8}

5 Las regiones variables CDR de las cadenas kappa y pesada (SEC ID N°: 126 y 125, respectivamente) del vector 3ee9pMORPHx9 (obtenido de acuerdo con los ejemplos 1-3) se insertaron en el vector H+LpattB (ML Laboratories) del siguiente modo. Para generar el vector 3ee9kappapAttB, en los sitios de las enzimas de restricción EcoRV - BsiWI de H+LpattB se insertó un fragmento de enzima de restricción EcoRV - BsiWI de aproximadamente 350 pares de bases de 3ee9pMORPHx9 (preparado de acuerdo con los ejemplos anteriores, por ejemplo los ejemplos 1-3).
 10 Después, el fragmento de las enzimas de restricción MfeI-BIpl de 350 pares de bases de 3ee9pMORPHx9 se insertó en los sitios de las enzimas de restricción EcoRI - BplI de 3ee9kappapAttB para generar 3ee9H+LpattB. Las secuencias de codificación de las cadenas pesada y ligera de 3ee9 (SEC ID N°: 126 y 125, respectivamente) se recombinaron después con pDONR221 (Invitrogen Cat.# 12536-017) usando la mezcla de enzimas Gateway BP Clonase II (Invitrogen Cat.# 11789-100) para generar el vector 3ee9H+LpENTR. El vector 3ee9_{H+L}pCMV_{UCOE8} se generó mediante recombinación entre 3ee9H+LpENTR y pCMV_{UCOE8_DEST} usando la mezcla de enzimas Gateway LR Clonase II (Invitrogen Cat.# 11791-100).

La construcción de pCMV_{UCOE8_DEST} fue la siguiente. El casete de conversión del vector Gateway (Invitrogen; cat# 11828-029) se insertó en el sitio SmaI de pCET906 para generar el vector pCET906_gw. El vector pCET906 se obtuvo de ML Laboratories y se describe completamente en Williams et. al., BMC Biotechnology, (2005), 5:17, que se incorpora en el presente documento por referencia. El fragmento de la enzima de restricción AgeI de aproximadamente 2.900 pares de bases de pCET906_gw se clonó después en el sitio AgeI de pCET1015 para generar pCMV_{UCOE8_DEST}. El vector pCET1015 también se obtuvo de ML Laboratories y se describe en Williams et al., supra. El vector pCMV_{UCOE8_DEST} se propagó en una cepa de *E. coli* resistente al gen de la toxina ccdB (p. ej., tal como los comercializados como "One Shot ccdB Survival T1 cells" from Invitrogen (n° cat. C7510-03)). En la Figura 29 se muestra la secuencia nucleotídica completa del inserto de 3ee9_{H+L}pCMV_{UCOE8}, es decir la secuencia completa de nucleótidos que codifica un anticuerpo IgG anti-MN humano que comprende las regiones variables CDR de las cadenas kappa y pesada de SEC ID N°: 126 y 125, respectivamente, obtenidas del vector 3ee9pMORPHx9.

Aislamiento del clon celular 3ee9.25

30 Para transfectar las células CHO-S con el vector 3ee9_{H+L}pCMV_{UCOE8}, 60 µg de ADM se diluyó en 2 ml de CD CHO (invitrogen#10743-029) completo con L-glutamina 8mM y HT(invitrogen) y que carece de PenStrep. Después, se añadieron 2 ml de medio CD CHO completo a un matraz erlenmeyer de 250 ml. Después, al matraz se añadieron 150 µl de DMRIE-C (Invitrogen n° cat.10459-014) y se incubaron a TA durante 10 minutos. A continuación, el ADN diluido se mezcló con el DMRIE-C diluido, se lavó con 5% de CO₂ y se incubó a TA durante 30 minutos. Durante la incubación se prepararon 4 ml de células CHO-S a 5x10⁶ c/ml (2x10⁷ de células totales) en medio CD CHO completo (sin P/S). Después de la incubación, las células se añadieron al matraz con complejo DNA-DMRIE-C y después se agitaron suavemente para mezclar. Después, el matraz se aclaró con 5% de CO₂ y se agitó a 125 rpm a 37 °C durante 4 horas. A continuación, al matraz se añadieron 32 ml de medio CD-CHO completo sin Pen Strep, se aclaró con 5% de CO₂ y después se devolvieron al agitador (37 °C) durante la noche. Tras 24 horas, se contaron las células, se centrifugaron y se resuspendieron en medio CD CHO completo más 5,5 ml/l de PenStrep con 20% de medio acondicionado y antibiótico (12,5 µg/ml de puromicina) a una densidad celular adecuada para sembrar en placas. Las células se sembraron a 100, 300, 900 y 2.700 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron después en un incubador de CO₂ durante aproximadamente 3 semanas. Se tomaron precauciones para no alterar las placas.

45 Los clones individuales se expandieron de las placas con pocillos que contienen colonias únicas en menos del 20% de los pocillos en la placa. Las células se expandieron a placas de 24 pocillos no tratadas con tejido con 1 ml de medio selectivo por pocillo. Las células se incubaron durante aproximadamente 1 semana durante la cual se añadieron 500 µl de medio fresco según era necesario. La expresión de anticuerpos se investigó a una dilución única para eliminar los clones que no expresan. Los clones se analizaron mediante ELISA por duplicado usando una dilución a 1:5 (5 ul del sobrenadante en 95 ul de TBS/tween). Se eliminaron los clones que dieron una DO (densidad óptica) inferior a 0,1. Los clones positivos se expandieron en placas de 6 pocillos no tratadas con tejido. Después se sembraron 5 ml de células a 4x10⁴ células/ml. Tras 4 días de incubación se determinó la expresión proteica mediante ELISA. Los clones se analizaron usando diluciones de 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400. El clon 3ee9.25 exhibió la concentración de anticuerpo secretado más elevada. Las células 3ee9.25 se transfirieron a un matraz agitador erlenmeyer de 125 ml sembrando a 2x10⁵ células/ml para adaptar las células al crecimiento en suspensión.

Expresión de las IgG anti-MN

Las células CHO-S transfectadas se sembraron en un biorreactor Wave de 10 litros (Wave Biotech, 300 Franklin Square Drive, Somerset, New Jersey, 08873, EE.UU.) a 500.000 células/ml. Las células se cultivaron durante siete días en 50% de medio CD-CHO (Invitrogen 10743), 50 % de medio CHO Sigma número 5 (Sigma 0363), 1% de

FCS, 1 x suplemento HT (Invitrogen 11067-030), penicilina/estreptomicina (Invitrogen 15140-122), L-glutamina 8 mM (Invitrogen 25030-081) y 12,5 µg/ml de puomicina (BD 631305) con el biorreactor en agitación a 25 rpm en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C. Al final del periodo de fermentación se recogió el medio de cultivo gastado mediante centrifugación y se esterilizó mediante filtración (0,2 µM) antes de la purificación de IgG.

5 Purificación de las IgG anti-MN.

Normalmente, de 10 a 20 l del medio de cultivo celular que contiene IgG se concentraron de 2 a 5 veces usando Prep-Scale TFF-2 30 kD Cartridge (Millipore). Al medio concentrado se añadió tampón Tris-Cl 1M, a pH 7,5 hasta la concentración final de 50 mM. Después se añadió NaCl 5,0 M hasta una concentración final de 150 mM. El medio concentrado se cargó normalmente en una columna de 30 ml de Protein Sepharose equilibrada con PBS, a pH 7,4. La columna se lavó con PBS a pH 7,4 que contiene 0,1% de Tween 20 y EDTA 1mM. Después, la columna se lavó con PBS y eluyó con tampón glicina 100 mM, pH 3,0. Tras la recolección, las fracciones se neutralizaron hasta un pH 7,5 con Tris-Cl 1M a pH 7,8. Las IgG purificadas se transfirieron a PBS mediante diálisis y se esterilizaron mediante filtración (0,2 µM). Las preparaciones de anticuerpo purificado finales se ajustaron a entre 1 y 5 mg/ml, exhibieron una pureza de ≥95% determinado mediante geles de SDS PAGE teñidos con azul de coomassie, tras lo cual la proteína migró como dos bandas correspondientes a las cadenas pesadas de Mr = 50 kDa y las cadenas ligeras de Mr 25 kDa, tenía unos niveles de endotoxina inferiores a 1 UE/mg de proteína e inferiores a 10% del agregado proteico determinado mediante SEC HPLC. Asimismo, las preparaciones se sometieron a QC funcional para la unión a antígeno de MN mediante resonancia de plasmón superficial, la unión a células que expresan MN mediante FACS e internalización en las células que expresan MN determinado mediante imágenes automáticas (Cellomics). Normalmente, una fermentación combinada de 20 l daba 1 gramo de proteína purificada con una recuperación global de 50 a 75%. La secuenciación en N-terminal de 255 pmol de la preparación final del anticuerpo 3ee9 de longitud completa usando un secuenciador ABI Procise 494 HT dio 368 pmol de la siguiente secuencia prevista para la cadena ligera kappa madura de: DIQMTQSPSSLASVGDRTIT-RASQDINNYLSWYQQKP-. Esta es la misma que la secuencia en N-terminal correspondiente a la cadena ligera kappa v madura del AcMo 3ee9 (SEC ID N°: 146). La cadena pesada no se detectó mediante secuenciación de Edman que muestra que su secuencia estaba bloqueada.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un sitio de unión a antígeno dirigido específicamente contra una proteína MN, en el que el sitio de unión a antígeno comprende un conjunto de secuencias de CDR de cadena pesada seleccionadas del grupo constituido por:

5 [3ee9] SEC ID N°: 57, 63 y 70;

y un conjunto de secuencias de CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo constituido por:

[3ee9] SEC ID N°: 89, 93 y 97.
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a la proteína MN con una constante de disociación de 0,15 nM a 50 nM.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo es una IgG, preferentemente IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3; IgM; IgD; IgE; IgA; IgM; fragmento Fab; fragmento F(ab')₂; fragmento scFv; fragmento Fv; un diacuerpo; anticuerpo lineal; anticuerpo monocatenario; anticuerpo biespecífico; anticuerpo quimérico o anticuerpo multiespecífico.
- 15 4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado.
5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, estando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con un agente citotóxico.
- 20 6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo constituido por: monometilauristatina-E o un análogo funcional de la misma, monometilauristatina-F o un análogo funcional de la misma, aplidina, azaribina, anastrozol, azacitidina, bleomicina, bortezomib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucilo, cisplatino, irinotecán (CPT-I 1), SN-38, carboplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, docetaxel, dactinomicina, daunomicina glucurónido, daunorrubicina, dexametasona, dietilestilbestrol, doxorubicina, doxorubicina glucurónido, epirubicina glucurónido, etinilestradiol, estramustina, etopósido, etopósido glucurónido, etopósido fosfato, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, fluorouracilo, fluoximesterona, gemcitabina, caproato de hidroxiprogesterona, hidrox urea, idarrubicina, ifosfamida, L-asparaginasa, leucovorina, lomustina, mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, fenil butirato, prednisona, procarbazona, paclitaxel, pentostatina, PSI-341, semustina estreptozocina, tamoxifeno, taxanos, taxol, propionato de testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepa, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, velcade, vinblastina, vinorelbina, vincristina, ricina, abrina, ribonucleasa, onconasa, rapLRI, DNasa I, enterotoxina A de Staphylococcus, proteína antivírica de la hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas o combinaciones de los mismos.
- 35 7. Una composición para usar en el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer relacionado con MN, opcionalmente cuando el cáncer es un tumor de, o que se origina en, mama, tracto respiratorio, pulmón, cerebro, órganos reproductores, tracto digestivo, colon, tracto urinario, riñón, esófago, cuello uterino, ojo, hígado, piel, cabeza, cuello, tiroides y paratiroides, comprendiendo la composición un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un agente anti-canceroso.
- 40 8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el agente anti-canceroso se selecciona del grupo constituido por bleomicina, docetaxel (Taxotere), doxorubicina, edatrexato, erlotinib (Tarceva), etopósido, finasterida (Proscar), flutamida (Eulexin), gemcitabina (Gemzar), genitininib (Iresa), acetato de goserelina (Zoladex), granisetron (Kytril), imatinib (Gleevec), irinotecán (Campto/Camptosar), ondansetrón (Zofran), paclitaxel (Taxol), pegaspargasa (Oncaspar), pilocarpina clorhidrato (Salagen), porfímero sódico (Photofrin), interleucina-2 (Proleukin), rituximab (Rituxan), topotecán (Hycamtin), trastuzumab (Herceptin), Triapine, vincristina, tartrato de vinorelbina (Navelbine), angiostatina, bevacizumab (Avastin®), sorafenib (Nexavar®), baculostatina, canstatina, maspina, anticuerpos o péptidos anti-VEGF, anticuerpos o péptidos anti-factor de crecimiento placentario, anticuerpos anti-Flk-1, anticuerpos o péptidos anti-Fit-1, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de la metaloproteínasa tisular, interferones, interleucina 12, IP-10, Gro-β, trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, Marimastat, polisulfato de pentosán, angiopoyetina 2, interferón alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor plaquetario 4 y minociclina.
- 55 9. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Un anticuerpo IgG anti-MN codificado por la secuencia de nucleótidos SEC ID N°: 153.

SEC ID N°	CDR	Secuencia de ADN	Código Fab
	VH3-CDR1		
1	1	GGATTACCTTTTCTTCTTATGGTATGTCT	3ee9
2	2	GGATTACCTTTTCTTCTTATGGTATGCAT	3ef2
3	3	GGATTACCTTTTCTAATAATGCTATGAAT	1e4
4	4	GGATTACCTTTTCTGATTATTCTATTAAT	3a4
5	5	GGATTACCTTTTCTTCTTATGGTATTTCT	3ab4, 3ah10
6	6	GGATTACCTTTTCTAATTATGGTATTTCT	3bb2
	VH3-CDR2		
7	1	GGTATCTCTTCTCTTGGTAGCACTACCTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGC	3ee9
8	2	GCTATCTCTTATTCTTCTAGCTCTACCTCTTATGCGG ATAGCGTGAAAGGC	3ef2
9	3	GGTATCTCTTATGATTCTAGCAAGACCTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGC	1e4
10	4	AATATCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGC	3a4
11	5	GGTATCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGC	3ab4
12	6	TCTATCTCTTATTCTGGTAGCAATACCTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGC	3ah10
13	7	GCTATCTCTTATTATGGTAGCAATACCTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGC	3bb2
	VH3-CDR3		
14	1	ACTGGTTCCTGGTACTTTTATGCATGGTGATCAT	3ee9
15	2	CTTTCTTATACTGGTTTTGCTGTT	3ef2
16	3	CTTACTTATACTGGTGCTTATCGT	1e4
17	4	TTTAAGTATTCTGGTGGTTCTGATTCT	3a4
18	5	CTTAAGCCTTATCGTCATAAGAATGGTTGGTTTGATT AT	3ab4
19	6	ATGAAGCCTATGCGTGGTTATTCTGGTGCTGTT	3ah10
20	7	CTTAAGGGTGGTTCTGGTTTTGTT	3bb2

Figura 1a

SEC ID Nº	CDR	Secuencia de ADN	Código Fab
	VH1b-CDR1		
21	1	GGATATACCTTTACTACTAATTATATGCAT	1aa1
	VH1b-CDR2		
22	1	ATTATCAATCCGCATAATGGCTCTACGTCTTACGCGC AGAAGTTTCAGGGC	1aa1
	VH1b-CDR3		
23	1	GGTCGTTATTTTCTTATGGATGTT	1aa1
	VH5-CDR1		
24	1	GGATATTCCTTTTCTAAGTATTGGATTGGT	5a6
25	2	GGATATTCCTTTACTGGTTATATTTCT	5aa3
	VH5-CDR2		
26	1	ATTATCTATCCGACTGATAGCTATACCCGTTATTCTC CGAGCTTTCAGGGC	5a6
27	2	ATTATCTATCCGGGTGATAGCTATACCAATTATTCTC CGAGCTTTCAGGGC	5aa3
	VH5-CDR3		
28	1	ACTCATGGTTATTATAAGAATGGTCGTATGGATGTT	5a6
29	2	TATTCTGGTCCTAATTGGGATGTTATGGATTCT	5aa3
SEC ID Nº	CDR	Secuencia de ADN	Código Fab
	Vk1-CDR1		
30	1	AGAGCGAGCCAGAATATTCTTTCTTATCTGAAT	1aa1
31	2	AGAGCGAGCCAGAATATTCTAATTATCTGAAT	3ab4
32	3	AGAGCGAGCCAGGATATTCTAATCGTCTGGCT	3ah10
33	4	AGAGCGAGCCAGGATATTAATAATTATCTGTCT	3ee9

Figura 1b

SEC ID N°	CDR	Secuencia de ADN	Código Fab
	VLk1- CDR2		
34	1	TATGCTGCTTCTTCTTTGCAAAGC	1aa1
35	2	CATAAGGTTTCTAATTTGCAAAGC	3ab4
36	3	TATGATGCTAATTCTTTGCAAAGC	3ah10
37	4	TATGGTGCTTCTAATTTGCAAAGC	3ee9
	VLk1- CDR3		
38	1	CAGCAGTATGGTTCTGTTCT	1aa1
39	2	CTTCAGTATGATGATTTTCTCGT	3ab4
40	3	TTTCAGTATTCTGGTCT	3ah10
41	4	CAGCAGTATTATGGTCGTCTACT	3ee9
	VLk2- CDR1		
42	1	AGAAGCAGCCAAAGCCTGGTTTATTCTAATGGCAATA CTACTCTGTCT	3bb2
43	2	AGAAGCAGCCAAAGCCTGGTTCATTCTAATGGCTATA ATTATCTGTCT	5a6
	VLk2- CDR2		
44	1	TATGGTGTTTCTAATCGTGCCAGT	3bb2
45	2	TATCTTGGTTCTAATCGTGCCAGT	5a6
	VLk2- CDR3		
46	1	CAGCAGTATAATTCTTTTCTCGT	3bb2
47	2	CATCAGTATGGTGATTTTCTGAT	5a6
	VLλ1- CDR1		
48	1	AGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTTCTTATTATGTGA AT	5aa3
	VLλ1- CDR2		
49	1	CTTCTGATTTATGCTGATGATAAGCGTCCCTCA	5aa3

Figura 1c

SEC ID N°	CDR	Secuencia de ADN	Código Fab
	VLλ1- CDR3		
50	1	CAGTCTTATGATTCTACTAAGGATGATTCT	5aa3
	VLλ3- CDR1		
51	1	AGCGGCGATAATCTTGTTCTTATTATGTTTCAT	1e4, 3ef2
52	2	AGCGGCGATAATCTTCCTGATTTTATGTTTCAT	3a4
	VLλ3- CDR2		
53	1	CTTGTGATTTATGATGATAATAATCGTCCCTCA	1e4, 3ef2
54	2	CTTGTGATTTCTGAGGATAATAAGCGTCCCTCA	3a4
	VLλ3- CDR3		
55	1	CAGTCTTATGATTTTGTAAGGTT	1e4, 3ef2
56	2	TCTACTTATGGTTATACTTATTCTTATTCT	3a4

Figura 1d

SEC ID N°	CDR	Secuencia de aminoácidos	Código Fab
	VH3- CDR1		
57	1	GFTFSSYGMS	3ee9
58	2	GFTFSSYGMH	3ef2
59	3	GFTFSNNAMN	1e4
60	4	GFTFSDYSIN	3a4
61	5	GFTFSSYGIS	3ab4, 3ah10
62	6	GFTFSNYGIS	3bb2
	VH3- CDR2		
63	1	GISSLGSTTYADSVKG	3ee9
64	2	AISYSSSSTSYADSVKG	3ef2
65	3	GISYDSSKTYADSVKG	1e4
66	4	NISYSGSSTYYADSVKG	3a4
67	5	GISYSGSSTYYADSVKG	3ab4
68	6	SISYSGSNTYYADSVKG	3ah10
69	7	AISYYGSNTYYADSVKG	3bb2
	VH3- CDR3		
70	1	TGSPGTFMHGDH	3ee9
71	2	LSYTGFAV	3ef2
72	3	LTYTGAYR	1e4
73	4	FKYSGGSDS	3a4
74	5	LKPYRHKNGWFDY	3ab4
75	6	MKPMRGYSGAV	3ah10
76	7	LKGGSGFV	3bb2
	VH1b- CDR1		
77	1	GYTFTTNYMH	1aa1
	VH1b- CDR2		
78	1	IINPHNGSTSYAQKFQG	1aa1
	VH1b- CDR3		
79	1	GRYFLMDV	1aa1
	VH5- CDR1		
80	1	GYSFSKYWIG	5a6
81	2	GYSFTGYIS	5aa3

Figura 2a

SEC ID Nº	CDR	Secuencia de aminoácidos	Código Fab
	VH5- CDR2		
82	1	IIYPTDSYTRYSPSFQG	5a6
83	2	IIYPGDSYTNYSFSFQG	5aa3
	VH5- CDR3		
84	1	THGYKNGRMDV	5a6
85	2	YSGPNWDVMDV	5aa3
	VLk1- CDR1		
86	1	RASQNILSYLN	1aa1
87	2	RASQINISNYLN	3ab4
88	3	RASQDISNRLA	3ah10
89	4	RASQDINNYLS	3ee9
	VLk1- CDR2		
90	1	YAASSLQS	1aa1
91	2	HKVSNLQS	3ab4
92	3	YDANSLQS	3ah10
93	4	YGASNLQS	3ee9
	VLk1- CDR3		
94	1	QQYGSVP	1aa1
95	2	LQYDDFPR	3ab4
96	3	FQYSGP	3ah10
97	4	QQYYGRPT	3ee9
	VLk2- CDR1		
98	1	RSSQSLVYSNGNTTSL	3bb2
99	2	RSSQSLVHSNGYNYLS	5a6
	VLk2- CDR2		
100	1	YGVSNRAS	3bb2
101	2	YLGSNRAS	5a6
	VLk2- CDR3		
102	1	QQYNSFPR	3bb2
103	2	HQYGDVSD	5a6

Figura 2b

SEC ID Nº	CDR	Secuencia de aminoácidos	Código Fab
	VLλ1- CDR1		
104	1	SGSSSNIGSYVFN	5aa3
	VLλ1- CDR2		
105	1	LLIYADDKRPS	5aa3
	VLλ1- CDR3		
106	1	QSYDSTKDDS	5aa3
	VLλ3- CDR1		
107	1	SGDNLGSYYVH	1e4, 3ef2
108	2	SGDNLPDFYVH	3a4
	VLλ3- CDR2		
109	1	LVIYDDNNRPS	1e4, 3ef2
110	2	LVI SEDNKRPS	3a4
	VLλ3- CDR3		
111	1	QSYDFGKV	1e4, 3ef2
112	2	STYGYTYSYS	3a4

Figura 2c

SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de ADN	Código Fab
113	VH1b	GAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCG GGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCCTCCGGA TATACCTTTACTACTAATTATATGCATTGGGTCCGC CAAGCCCCTGGGCAGGGTCTCGAGTGGATGGGCATT ATCAATCCGCATAATGGCTCTACGCTTACGCGCAG AAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATGACCCGTGATACC AGCATTAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTG CGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT GGTCGTTATTTTCTTATGGATGTTTGGGGCCAAGGC ACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	1aa1
114	Vk1	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCTAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA GCGAGCCAGAAATATTTCTTTCTTATCTGAATTGGTAC CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATT TATGCTGCTTCTTCTTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCC CGTTTTAGCGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACC CTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCG GTTTATTATTGCCAGCAGTATGGTCTGTTCCTACC TTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACG	1aa1
115	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTAATAATGCTATGAATTGGGTGCGC CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGT ATCTCTTATGATTCTAGCAAGACCTATTATGCGGAT AGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAAT TCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT CTTACTTATACTGGTGCTTATCGTTGGGGCCAAGGC ACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	1e4
116	VL3	GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTT GCACCAGGTCAGACCGCGGTATCTCGTGTAGCGGC GATAATCTTGGTCTTATTATGTTTCATTGGTACCAG CAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTAT GATGATAATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGC TTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTG ACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGAT TATTATTGCCAGTCTTATGATTTTGGTAAGGTTGTG TTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC	1e4

Figura 3a

SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de ADN	Código Fab
117	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTGATTATCTATTAATTGGGTGCGC CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTATGTGAGCAAT ATCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGGAT AGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAAT TCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT TTAAGTATTCTGGTGGTTCTGATTCTTGGGGCCAA GGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	3a4
118	VL3	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGCGTT GCACCAGGTCAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGC GATAATCTTCCTGATTTTATGTTTCATTGGTACCAG CAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTCTTGTGATTTCT GAGGATAATAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGC TTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTG ACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGAT TATTATTGCTCTACTTATGGTTATACTTATTCTTAT TCTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC	3a4
119	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATTCTTGGGTGCGC CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGT ATCTCTTATTCTGGTAGCTCTACCTATTATGCGGAT AGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAAT TCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT CTTAAGCCTTATCGTCATAAGAATGGTTGGTTTGGT TATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA GC	3ab4
120	Vk1	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA GCGAGCCAGAATATTTCTAATTATCTGAATTGGTAC CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCAGAACTATTAATT CATAAGGTTTCTAATTGCAAAGCGGGTCCCGTCC CGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCAC TGATTTTACC CTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCG GTTTATTATTGCCTTCAGTATGATGATTTTCTCTCGT ACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACCGT ACG	3ab4

Figura 3b

SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de ADN	Código Fab
121	VH3	<p><u>GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCG</u> <u>GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA</u> <u>TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATTTCTTGGGTGCGC</u> <u>CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCTCT</u> <u>ATCTCTTATTCTGGTAGCAATACCTATTATGCGGAT</u> <u>AGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAAT</u> <u>TCGAAAAACACCCGTATCTGCAAATGAACAGCCTG</u> <u>CGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGT</u> <u>ATGAAGCCTATGCGTGGTTATTCTGGTGCTGTTTGG</u> <u>GGCCAAGGCACCCGTGTGACGGTTAGCTCAGC</u></p>	3ah10
122	Vk1	<p><u>GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGC</u> <u>GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA</u> <u>GCGAGCCAGGATATTTCTAATCGTCTGGCTTGGTAC</u> <u>CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATT</u> <u>TATGATGCTAATTTCTTTGCAAAGCGGGTCCCCTCC</u> <u>CGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACC</u> <u>CTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCG</u> <u>ACTTATTATTGCTTTCAGTATTCTGGTCCACCTTT</u> <u>GGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGTACG</u></p>	3ah10
123	VH3	<p><u>GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCG</u> <u>GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA</u> <u>TTTACCTTTTCTAATTATGGTATTTCTTGGGTGCGC</u> <u>CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCT</u> <u>ATCTCTTATTATGGTAGCAATACCTATTATGCGGAT</u> <u>AGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAAT</u> <u>TCGAAAAACACCCGTATCTGCAAATGAACAGCCTG</u> <u>CGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGT</u> <u>CTTAAGGGTGGTCTGGTTTTGTTTGGGGCCAAGGC</u> <u>ACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC</u></p>	3bb2
124	Vk2	<p><u>GATATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCCTGCCA</u> <u>GTGACTCCGGGCGAGCCTGCGAGCATTAGCTGCAGA</u> <u>AGCAGCCAAAGCCTGGTTTATTCTAATGGCAATACT</u> <u>ACTCTGTCTTGGTACCTTCAAAAACCAGGTCAAAGC</u> <u>CCGCAGCTATTAATTTATGGTGTTCCTAATCGTGCC</u> <u>AGTGGGGTCCCAGATCGTTTTAGCGGCTCTGGATCC</u> <u>GGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGTGTGGAA</u> <u>GCTGAAGACGTGGGCGTGTATTATTGCCAGCAGTAT</u> <u>AATTCTTTTCTCGTACCTTTGGCCAGGGTACGAAA</u> <u>GTTGAAATTAACGTACG</u></p>	3bb2

Figura 3c

SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de ADN	Código Fab
125	VH3	GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCG GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATGTCTTGGGTGCGC CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGT ATCTCTTCTCTTGGTAGCACTACCTATTATGCGGAT AGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAAT TCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT ACTGGTTCCTGGTACTTTTATGCATGGTGATCAT TGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	3ee9
126	Vk1	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGA GCGAGCCAGGATATTAATAATTATCTGTCTTGGTAC CAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAACTATTAATT TATGGTGCTTCTAATTTGCAAAGCGGGTCCCCTCC CGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACC CTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCG GTTTATTATTGCCAGCAGTATTATGGTCGTCCACT ACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAACGT ACG	3ee9
127	VH5	GAATTGGTTCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCG GGCGAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGA TATTCCTTTTCTAAGTATTGGATTGGTTGGGTGCGC CAGATGCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGGGCATT ATCTATCCGACTGATAGCTATACCCGTTATTCTCCG AGCTTTCAGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAA AGCATTAGCACCGCGTATCTTCAATGGAGCAGCCTG AAAGCGAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCGCGT ACTCATGGTTATTATAAGAATGGTCGTATGGATGTT TGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC	5a6
128	Vk2	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCCTGCCA GTGACTCCGGGCGAGCCTGCGAGCATTAGCTGCAGA AGCAGCCAAAGCCTGGTTCAATTCTAATGGCTATAAT TATCTGTCTTGGTACCTTCAAAAACCAGGTCAAAGC CCGCAGCTATTAATTTATCTTGGTCTAATCGTGCC AGTGGGGTCCCAGATCGTTTTAGCGGCTCTGGATCC GGCACCGATTTACCCTGAAAATTAGCCGTGTGGAA GCTGAAGACGTGGGCGTGTATTATTGCCATCAGTAT GGTGATTTTCTGATACCTTTGGCCAGGGTACGAAA GTTGAAATTAACGTACG	5a6

Figura 3d

SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de ADN	Código Fab
129	VH5	<u>GAATTGGTTCAGAGCGGCGGGAAGTGAAAAACCG</u> <u>GGCGAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGTTCCGGA</u> <u>TATTCCTTTACTGGTTATATTTCTTGGGTGCGCCAA</u> <u>GCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATGGGCATTATC</u> <u>TATCCGGGTGATAGCTATAACCAATTATTCCTCCGAGC</u> <u>TTTCAGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAAGC</u> <u>ATTAGCACC CGGTATCTTCAATGGAGCAGCCTGAAA</u> <u>GCGAGCGATACGGCCATGTATTATTGCGCGCGTTAT</u> <u>TCTGGTCCTAATTGGGATGTTATGGATTCTTGGGGC</u> <u>CAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC</u>	5aa3
130	VL1	<u>GATATCGTGCTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGTGGC</u> <u>GCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCGGC</u> <u>AGCAGCAGCAACATTGGTTCATTATATGTGAATTGG</u> <u>TACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAAACTTCTG</u> <u>ATTTATGCTGATGATAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCG</u> <u>GATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCG</u> <u>AGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA</u> <u>GCGGATTATTATTGCCAGTCTTATGATTCTACTAAG</u> <u>GATGATTCTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC</u>	5aa3
131	VH3	<u>GAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCG</u> <u>GGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGA</u> <u>TTTACCTTTTCTTCTTATGGTATGCATTGGGTGCGC</u> <u>CAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTATGTGAGCGCT</u> <u>ATCTCTTATTCTTCTAGCTCTACCTCTTATGCGGAT</u> <u>AGCGTGAAAGGCCGTTTACCATTTACGTGATAAT</u> <u>TCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG</u> <u>CGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT</u> <u>CTTCTTTATACTGGTTTTGCTGTTTGGGGCCAAGGC</u> <u>ACCTGGTGACGGTTAGCTCAGC</u>	3ef2
132	VL3	<u>GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTT</u> <u>GCACCAGGTCAGACCGCGGTATCTCGTGTAGCGGC</u> <u>GATAATCTTGGTTCATTATATGTTTCATTGGTACCAG</u> <u>CAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTAT</u> <u>GATGATAATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGC</u> <u>TTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCTG</u> <u>ACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGAT</u> <u>TATTATTGCCAGTCTTATGATTTTGGTAAGGTTGTG</u> <u>TTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC</u>	3ef2

Figura 3e

SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de proteínas	Código Fab
133	VH1b	<u>ELVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTNYM</u> <u>HWVRQAPGQGLEWMGIINPHNGSTSYAQKFOG</u> <u>RVTMTRDTSISSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR</u> <u>GRYFLMDVWGQGTTLVTVSS</u>	1aa1
134	Vk1	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNILSY</u> <u>LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG</u> <u>SGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYGSVPT</u> <u>FGQGTKVEIKRT</u>	1aa1
135	VH3	<u>ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNNAM</u> <u>NWVRQAPGKGLEWVSGISYDSSKTYADSVKG</u> <u>RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u> <u>LTYTGAYRWGQGTTLVTVSS</u>	1e4
136	VL3	<u>DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGSYYV</u> <u>HWYQQKPGQAPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGS</u> <u>NSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDFGKVV</u> <u>FGGGTKLTVL</u>	1e4
137	VH3	<u>ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYSI</u> <u>NWVRQAPGKGLEIVSNISYSGSSTYYADSVKG</u> <u>RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u> <u>FKYSGGSDSWGQGTTLVTVSS</u>	3a4
138	VL3	<u>DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLPDFYV</u> <u>HWYQQKPGQAPVLVISEDNKRPSGIPERFSGS</u> <u>NSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSTYGYTYSY</u> <u>SVFGGGTKL</u>	3a4
139	VH3	<u>ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGI</u> <u>SWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSSTYYADSVKG</u> <u>RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u> <u>LKPYRHKNGWFQYWGQGTTLVTVSS</u>	3ab4
140	Vk1	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNISNY</u> <u>LNWYQQKPGKAPKLLIHKVSNLQSGVPSRFSG</u> <u>SGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCLQYDDFPR</u> <u>TFGQGTKVEIKRT</u>	3ab4
141	VH3	<u>ELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGI</u> <u>SWVRQAPGKGLEWVSSISYSGSNTYYADSVKG</u> <u>RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u> <u>MKPMRGYSGAVWGQGTTLVTVSS</u>	3ah10
142	Vk1	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNR</u> <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYDANSLQSGVPSRFSG</u> <u>SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQYSGPTF</u> <u>GQGTKVEIKRT</u>	3ah10

Figura 4a

SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de proteínas	Código Fab
143	VH3	<u>ELVESGGGLVQPGGSLRLS</u> CAASGFTFSNYGI <u>SWVRQAPGKGLEWVSAISYYGSNTYYADSVKG</u> <u>RFTISRDN SKNTLYLQMN</u> SLRAEDTAVYYCAR LKGGSGFVWGQGTLVTVSS	3bb2
144	Vk2	DIVMTQSP ^{LSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYS} <u>NGNTLSWYLQKPGQSPQLLIYGV</u> SNRASGVP <u>DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQOY</u> NSFPRTFGQGTKVEIKRT	3bb2
145	VH3	<u>ELVESGGGLVQPGGSLRLS</u> CAASGFTFSSYGM <u>SWVRQAPGKGLEWVSGIS</u> SLGSTTYADSVKG <u>RFTISRDN SKNTLYLQMN</u> SLRAEDTAVYYCAR TGSPGTFMHGDHWGQGTLVTVSS	3ee9
146	Vk1	DIQMTQSP ^{SSLSASVGRVTITCRASQDINNY} <u>LSWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSR</u> FSG <u>SGSGTDFTLTIS</u> SLQPEDFAVYYCQYYGRPT TFGQGTKVEIKRT	3ee9
147	VH5	<u>ELVQSGAEVKKP</u> GESLKISCKGSGYSFSKYWI <u>GWVRQMPGKGLEWMGIIYPTDSYTRYSP</u> SFQG <u>QVTISADKSISTAYLQWSS</u> LKASDTAMYYCAR THGYKNGRMDVWGQGTLVTVSS	5a6
148	Vk2	DIVMTQSP ^{LSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHS} <u>NGYNYLSWYLQKPGQSPQLLIYLGS</u> NRASGVP <u>DRFSGSGSGTDFTLKI</u> SRVEAEDVGVYYCHQY GDFSDFGQGTKVEIKRT	5a6
149	VH5	<u>ELVQSGAEVKKP</u> GESLKISCKGSGYSFTGYIS <u>WVRQAPGKGLEWMGIIY</u> PGDSYTNYS ^{SPSFQGO} <u>VTISADKSISTAYLQWSS</u> LKASDTAMYYCARY SGPNWDVMDSWGQGTLVTVSS	5aa3
150	VL1	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSY <u>YVNWYQQLPGTAPKLLIY</u> ADDKRPSGVPDRFS <u>GSKSGTSA</u> SLAITGLQSEADY ^{CQSYDSTK} DDSVFGGGTKL	5aa3
151	VH3	<u>ELVESGGGLVQPGGSLRLS</u> CAASGFTFSSYGM <u>HWVRQAPGKGLE</u> YVSAISYSSSSTSYADSVKG <u>RFTISRDN SKNTLYLQMN</u> SLRAEDTAVYYCAR LSYTGFAVWGQGTLVTVSS	3ef2

Figura 4b

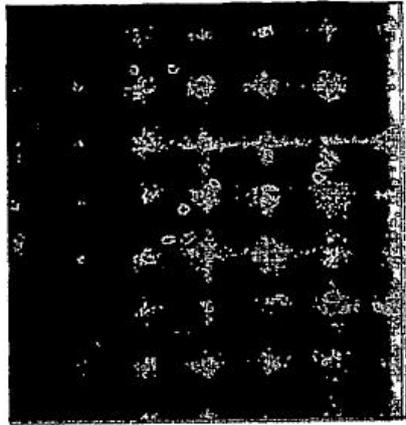
SEC ID N°	Cadena de anticuerpo	Secuencia de proteínas	Código Fab
152	VL3	<u>D</u> I <u>E</u> L <u>T</u> QPPSVSVAPGQTARIS <u>C</u> SGDNLGSYYV <u>H</u> WYQOKPGQAPVLV <u>I</u> YDDNNRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAEDEADYYC <u>Q</u> SYDFGKVV FGGGTKL	3ef2

Figura 4c

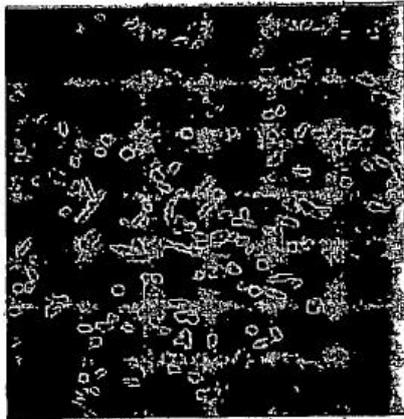
Anti-cuerpo	Forma de anticuerpo usada	Unión ELISA a MN humana purificada expresada en células HKB-11	Unión ELISA a MN humana purificada expresada en células	Afinidad de unión por MN humana purificada expresada en células HKB-11 Kd (M)
1aa1	Fab puro	Positiva	Positiva	$1,5 \times 10^{-10}$
1aa1	IgG1 pura	Positiva	ND ¹	$4,9 \times 10^{-8}$
1e4	Fab puro	Positiva	ND	$1,4 \times 10^{-9}$
1e4	IgG1 pura	Positiva	ND	$1,0 \times 10^{-9}$
3a4		Positiva	Positiva	
3ab4	Fab puro	Positiva	Positiva	$5,0 \times 10^{-8}$
3ah10	Fab puro	Positiva	ND	$1,6 \times 10^{-8}$
3bb2	Fab puro	Positiva	ND	$2,7 \times 10^{-8}$
3ee9	Fab bruto	Positiva	Positiva	$1,6 \times 10^{-8}$
3ee9	IgG1 pura	Positiva	ND	$5,9 \times 10^{-9}$
5a6	Fab bruto	Positiva	Positiva	$3,4 \times 10^{-9}$
5aa3	Fab bruto	Positiva	Positiva	$2,5 \times 10^{-8}$
3ef2	Fab bruto	Positiva	Positiva	$4,1 \times 10^{-9}$

¹ND = no determinado

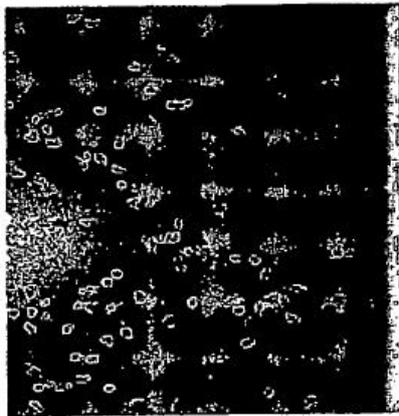
Figura 5



AcMo anti-MN1e4



IgG control



Vehículo tampón

Figura 6

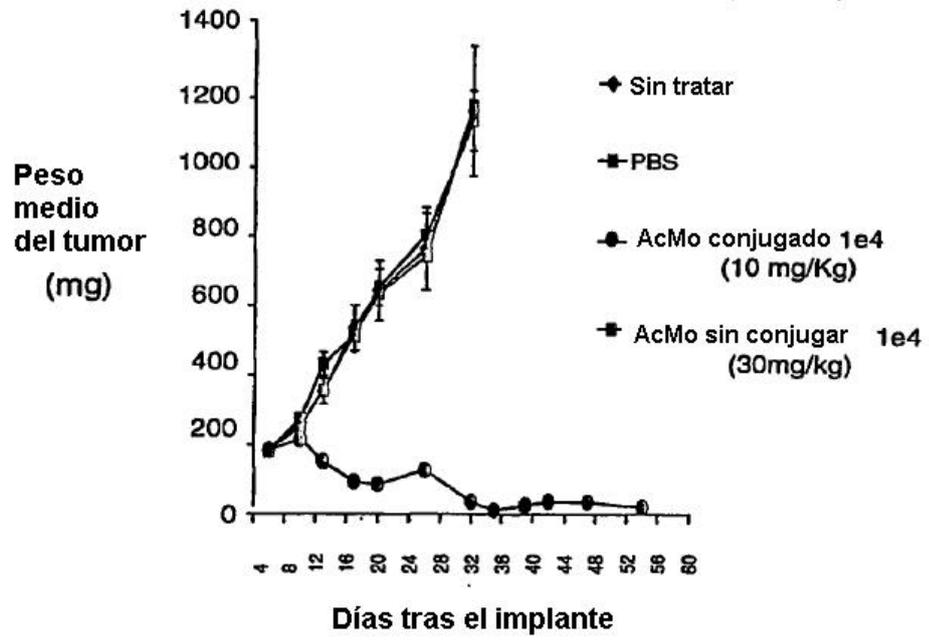


Figura 7

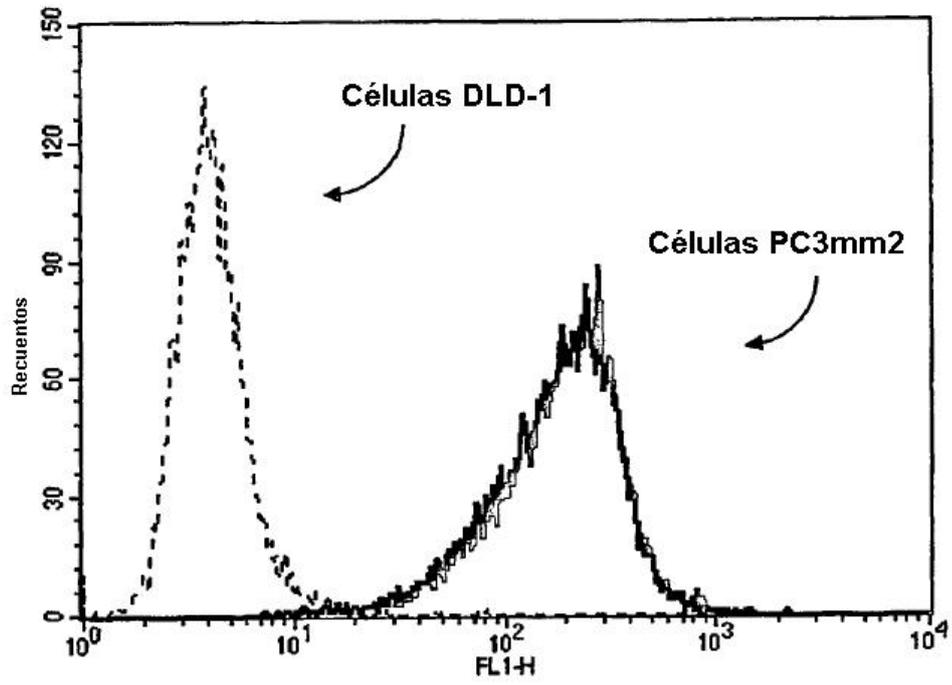


Figura 8

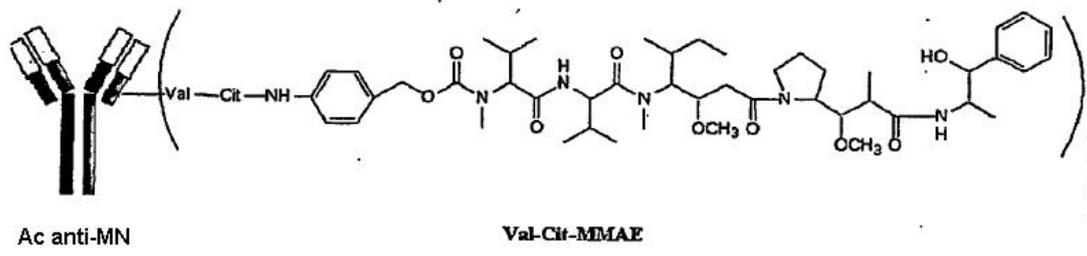


Figura 9

3ee9

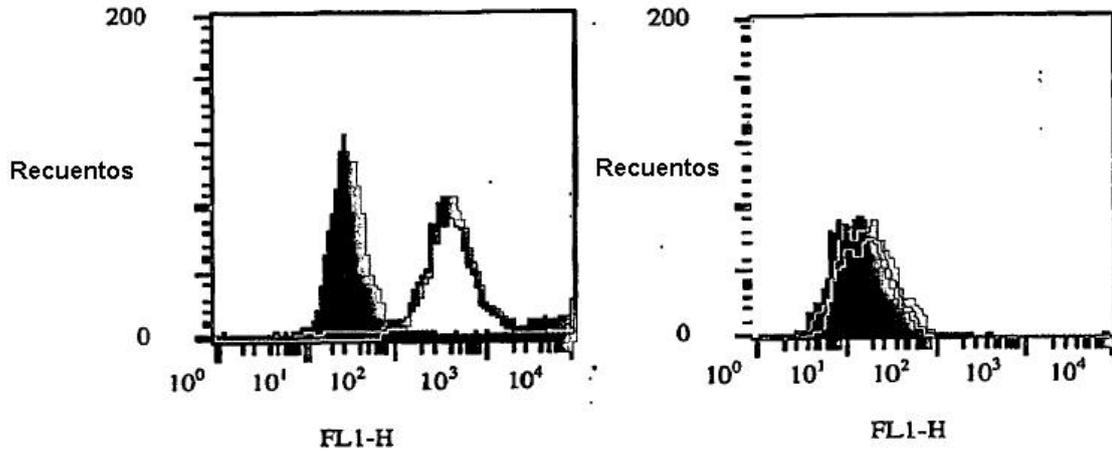


Figure 10a

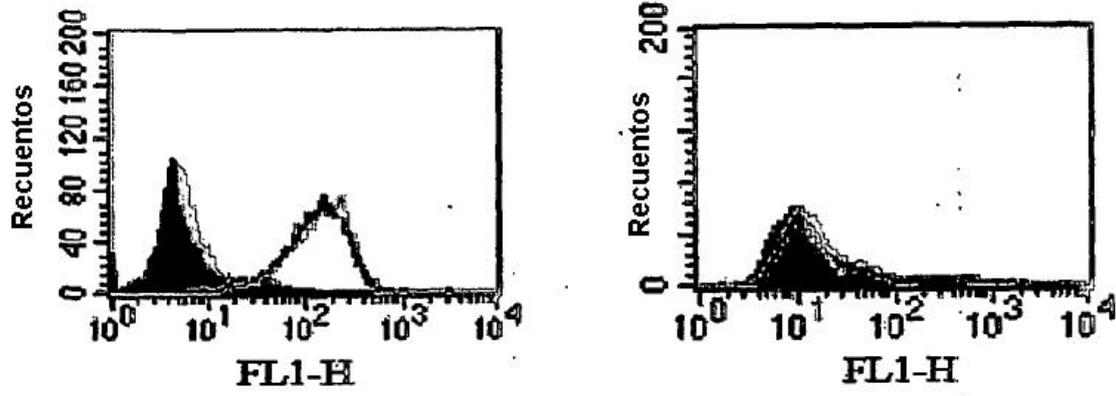


Figura 10b

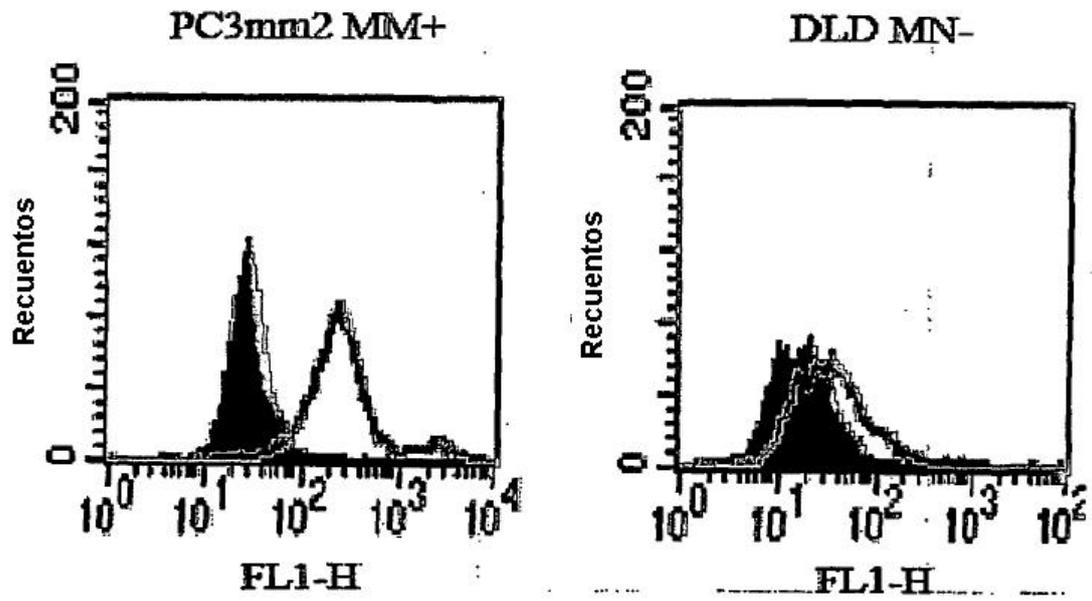


Figura 10c

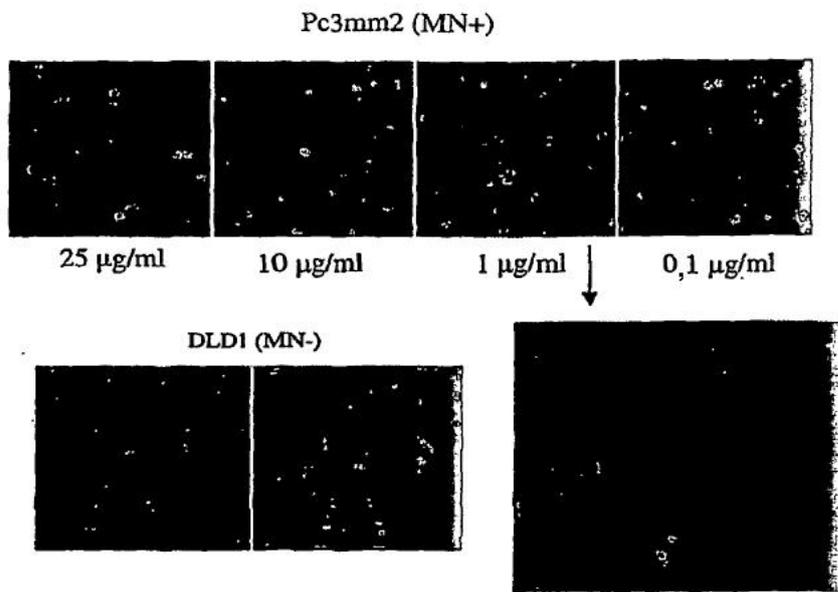


Figura 11a

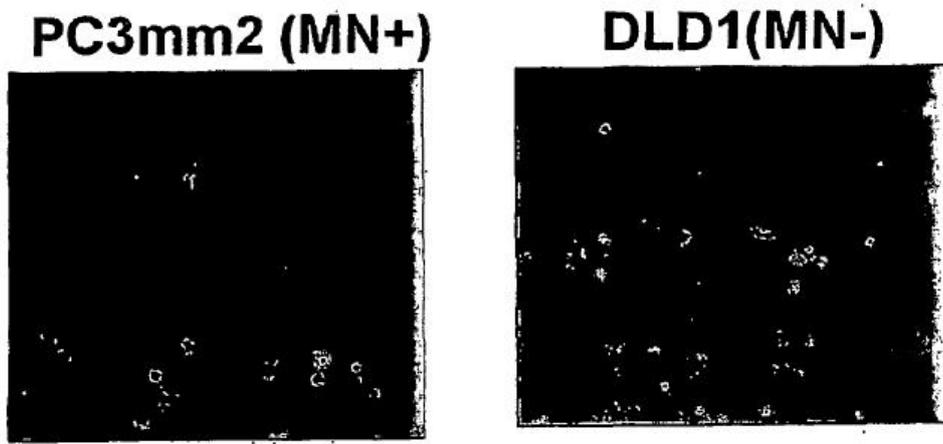


Figura 11b

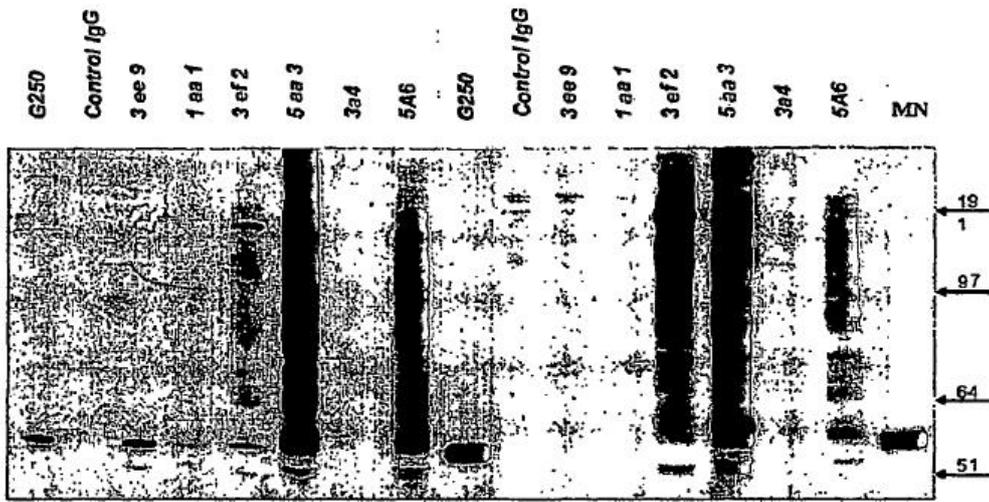


Figura 12

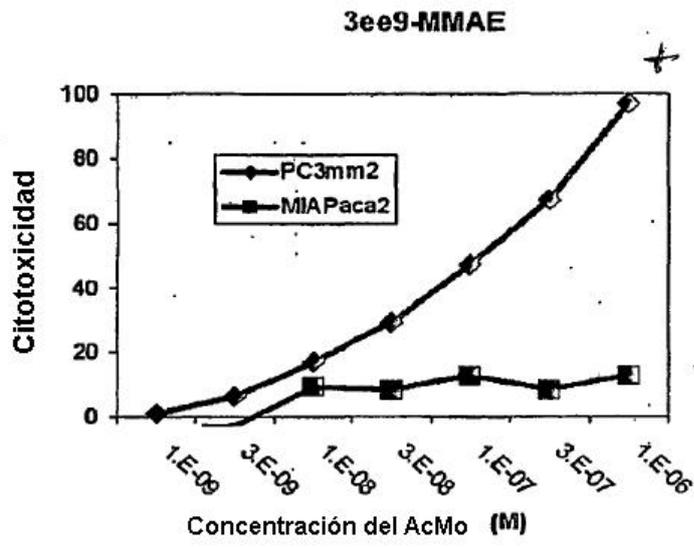


Figura 13a

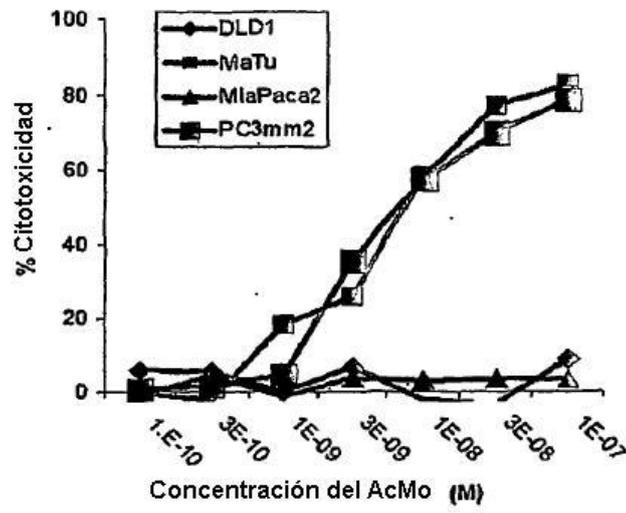


Figura 13b

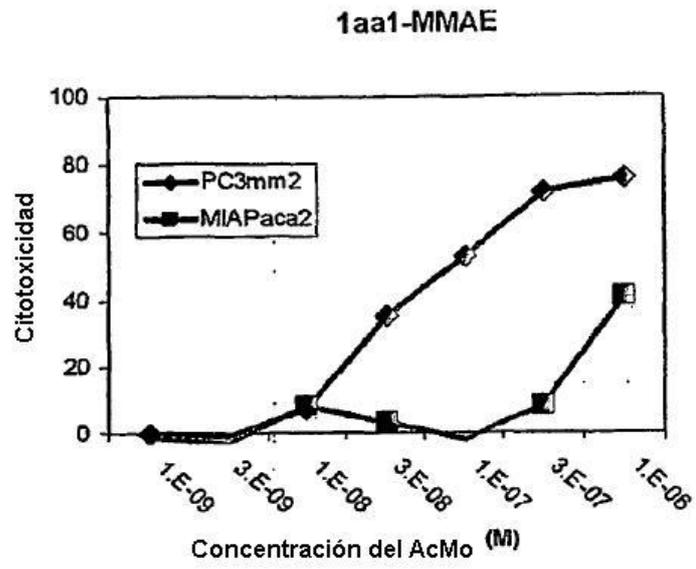


Figura 13c

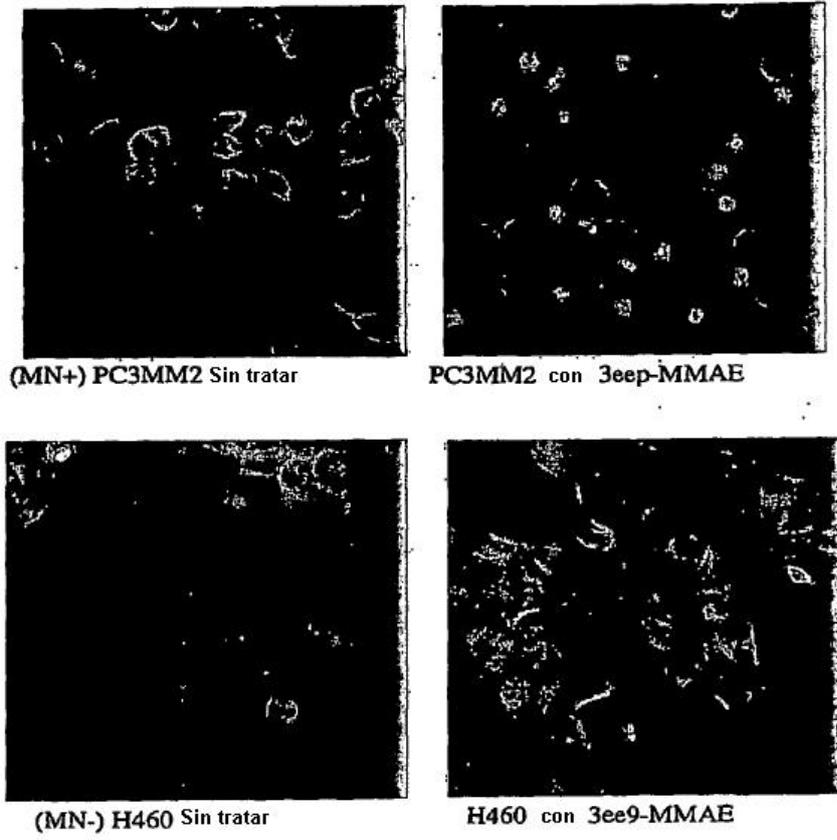


Figura 14

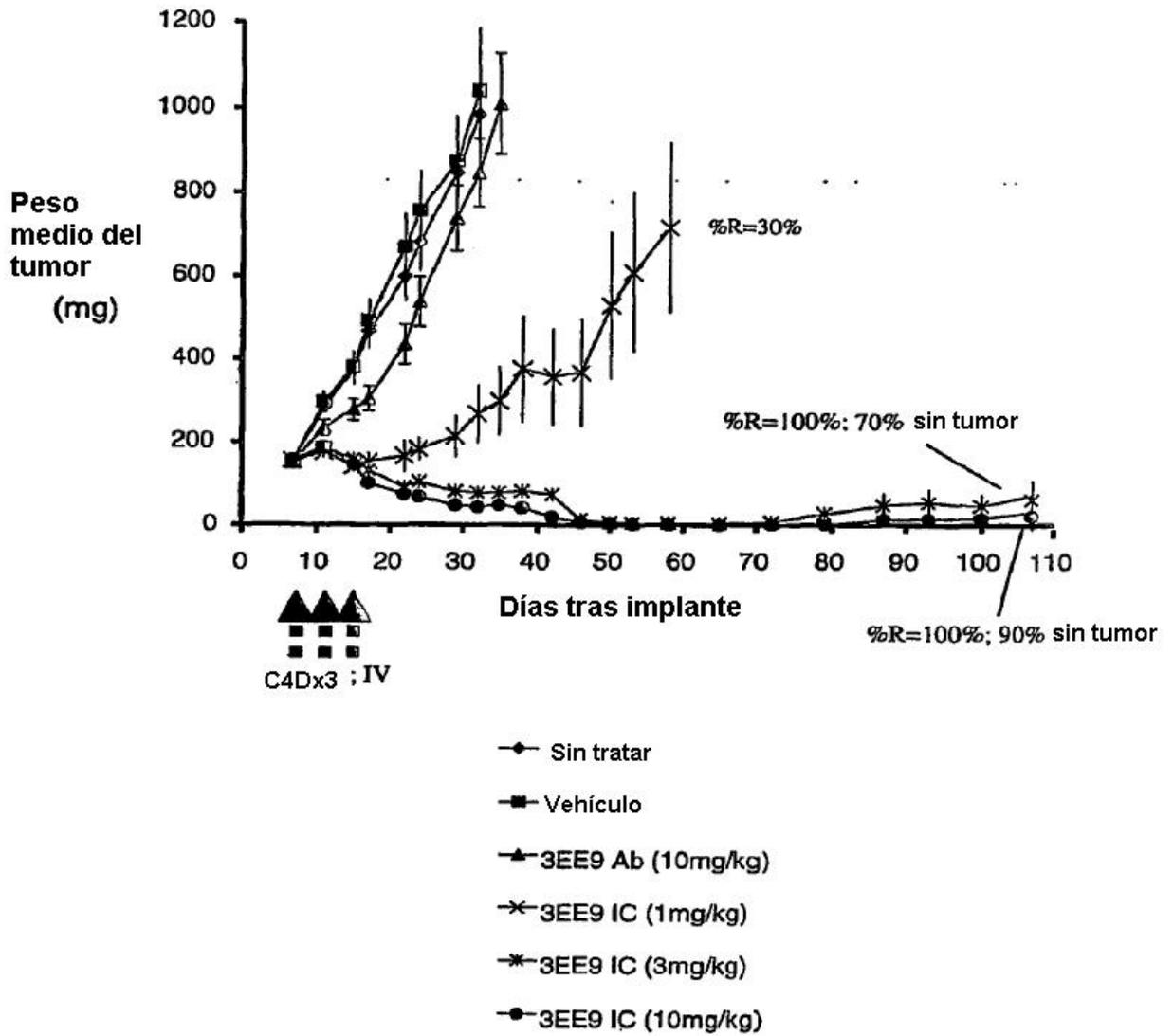


Figura 15

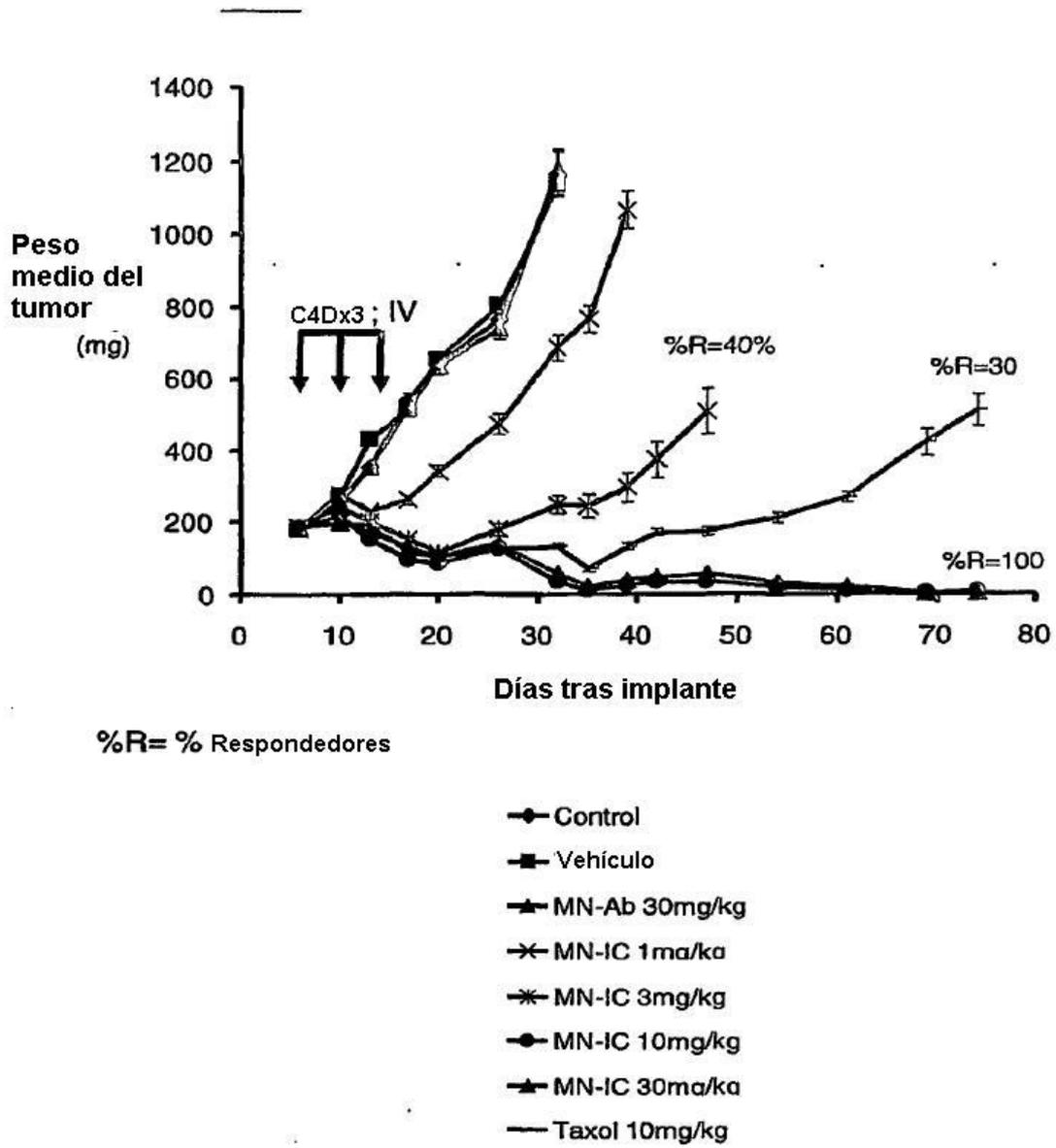


Figura 16

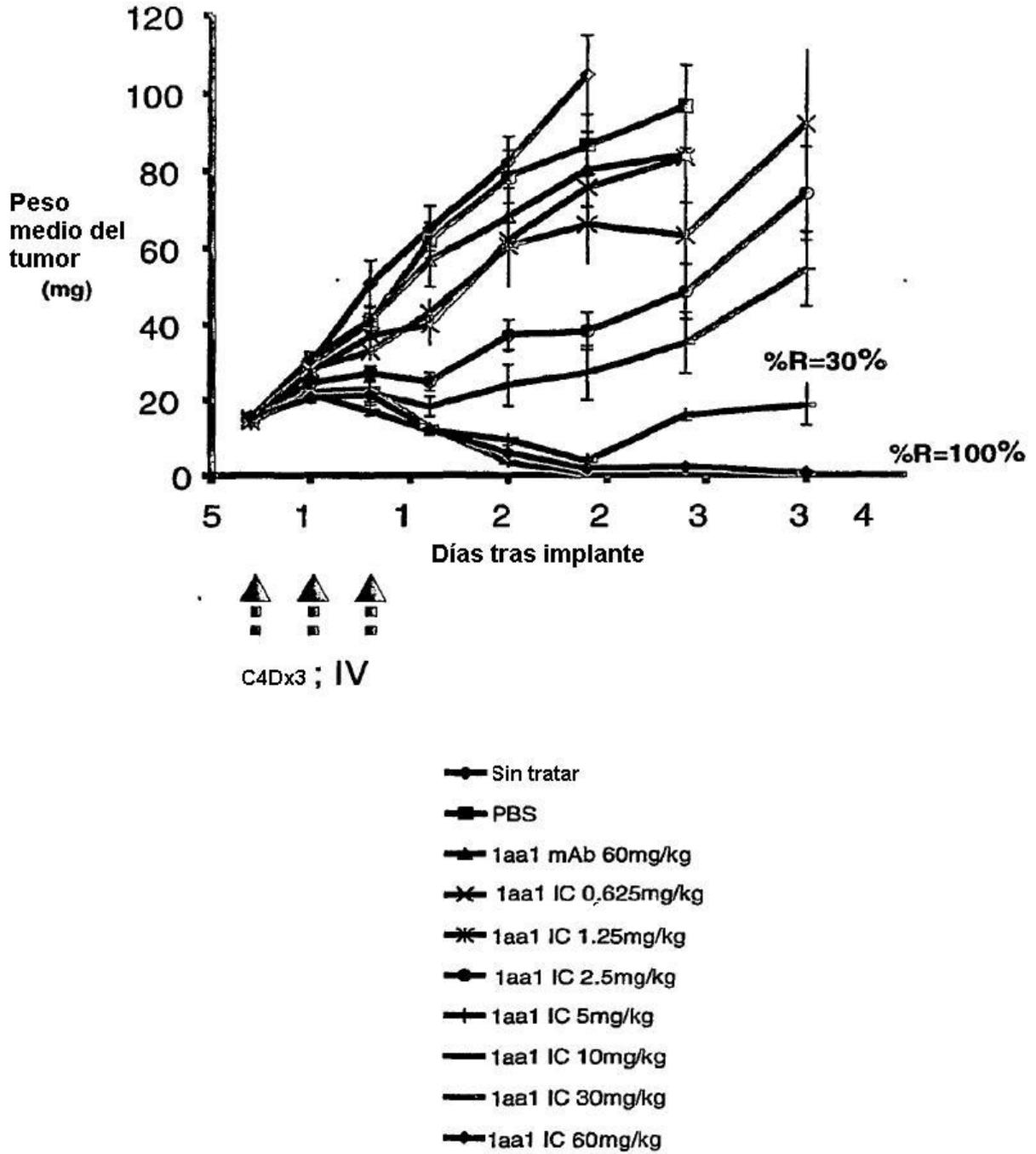
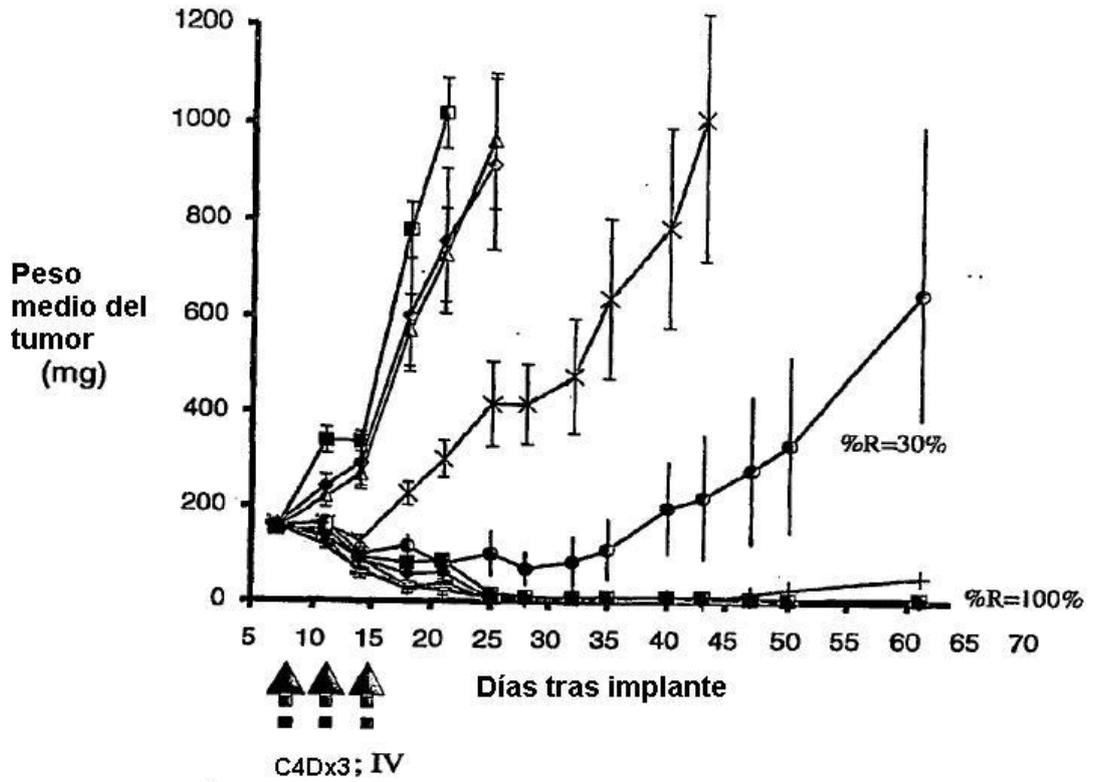


Figura 17



- Sin tratar
- PBS
- ▲— 3ee9 mAb 60mg/kg
- ×— 3ee9 IC 0,625mg/kg
- 3ee9 IC 1.25mg/kg
- +— 3ee9 IC 2,5mg/kg
- 3ee9 IC 5mg/kg
- — 3ee9 IC 10mg/kg
- ◆— 3ee9 IC 30mg/kg
- 3ee9 IC 60mg/kg (9/10)

Figura 18

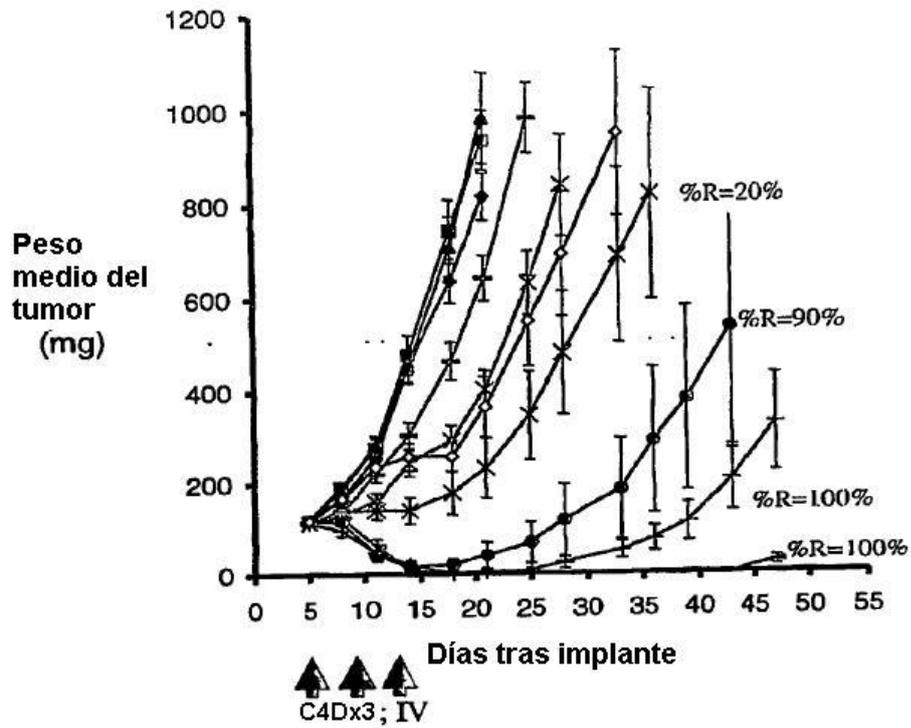
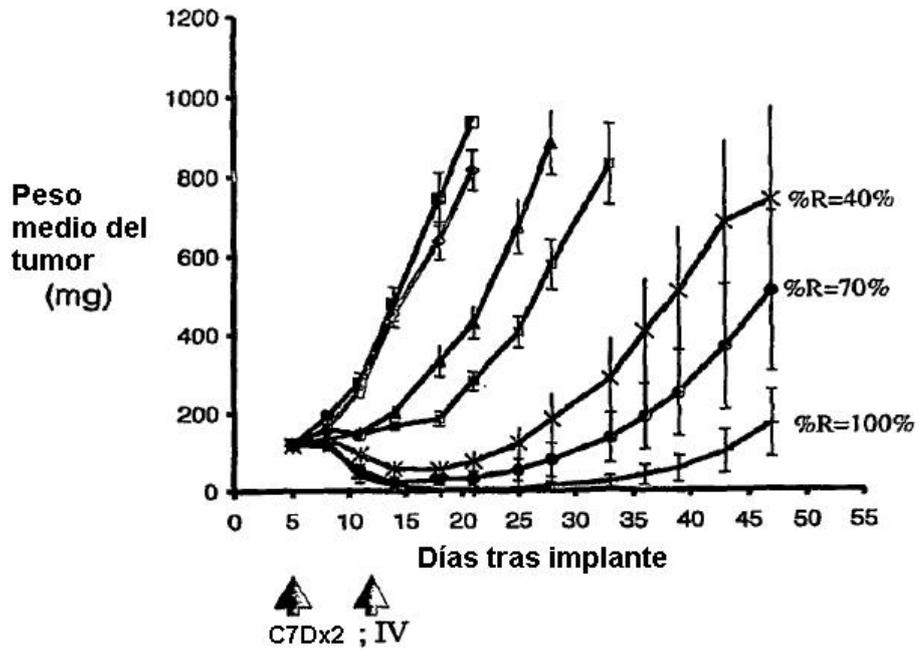
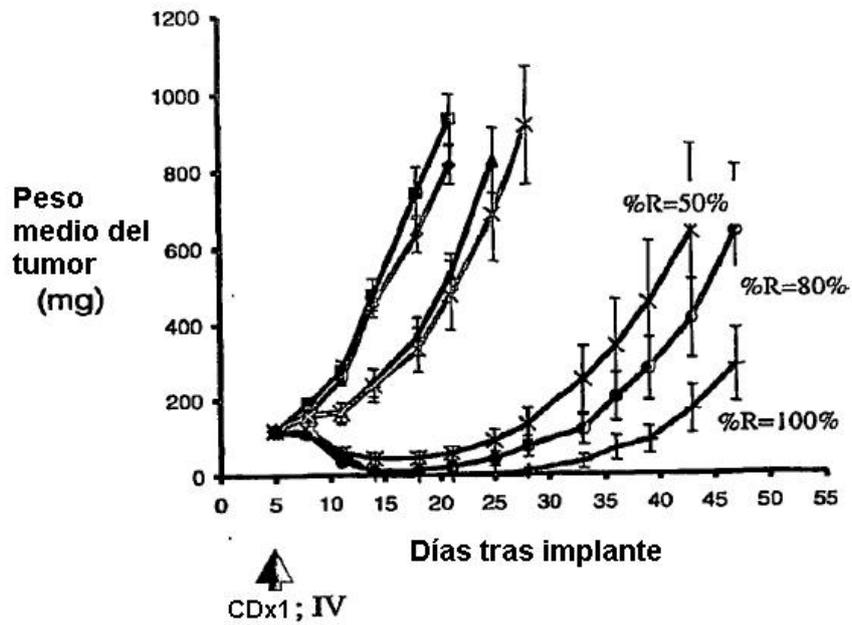


Figura 19



- ◆ Sin tratar
- Vehiculo
- ▲ 3ee9 Conj @ 0,625 mg/kg
- 3ee9 Conj @ 1,25 mg/kg
- * 3ee9 Conj @ 2,5 mg/kg
- 3ee9 Conj @ 5 mg/kg
- ◆ 3ee9 Coni @ 10 ma/ka

Figura 20



- Sin tratar
- Vehículo
- ▲— 3ee9 Conj @ 0,625 mg/kg
- ×— 3ee9 Conj @ 1,25 mg/kg
- *— 3ee9 Conj @ 2,5 mg/kg
- ◆— 3ee9 Conj @ 5 mg/kg
- +— 3ee9 Conj @ 10 mg/kg

Figura 21

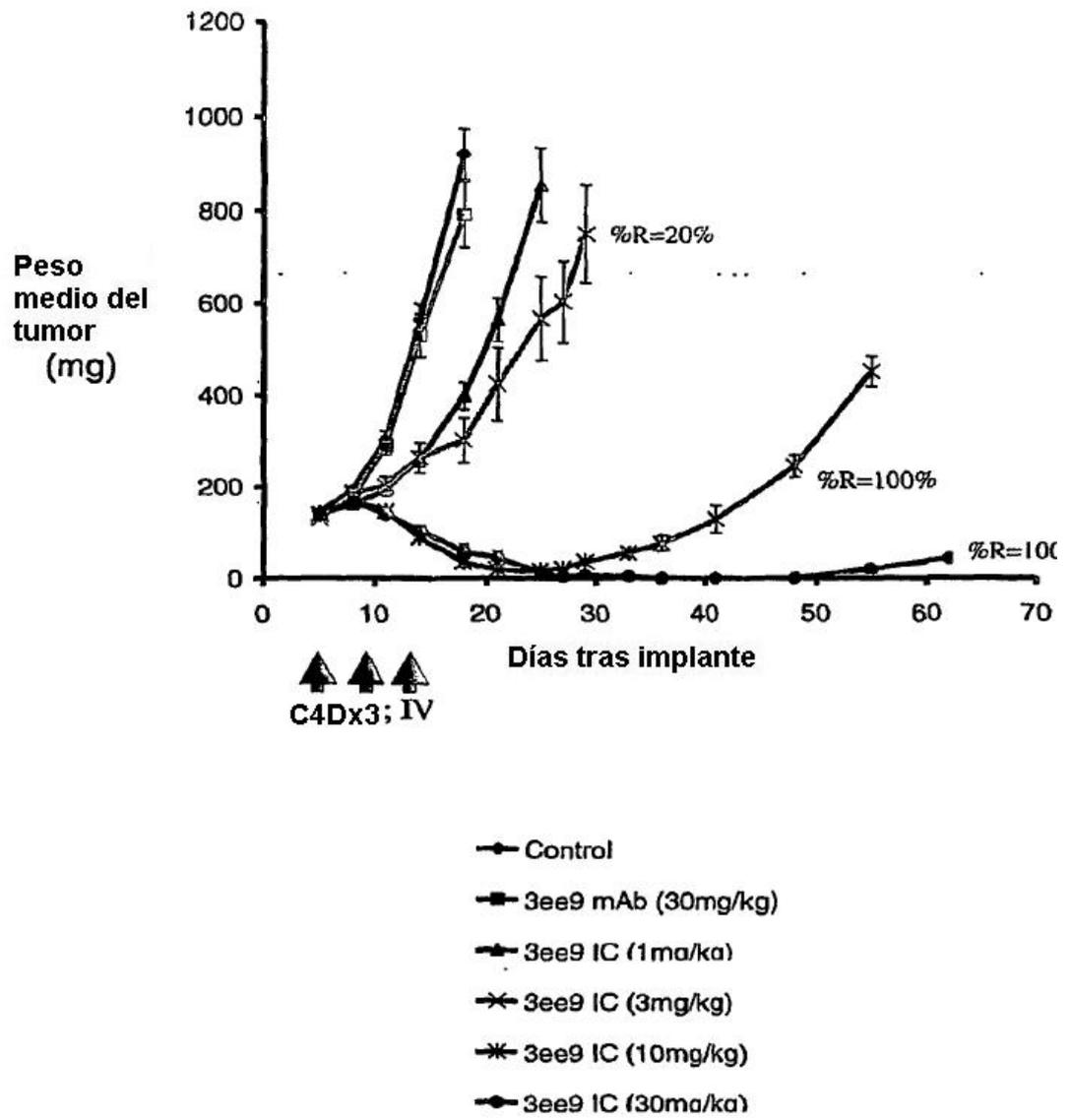


Figura 22

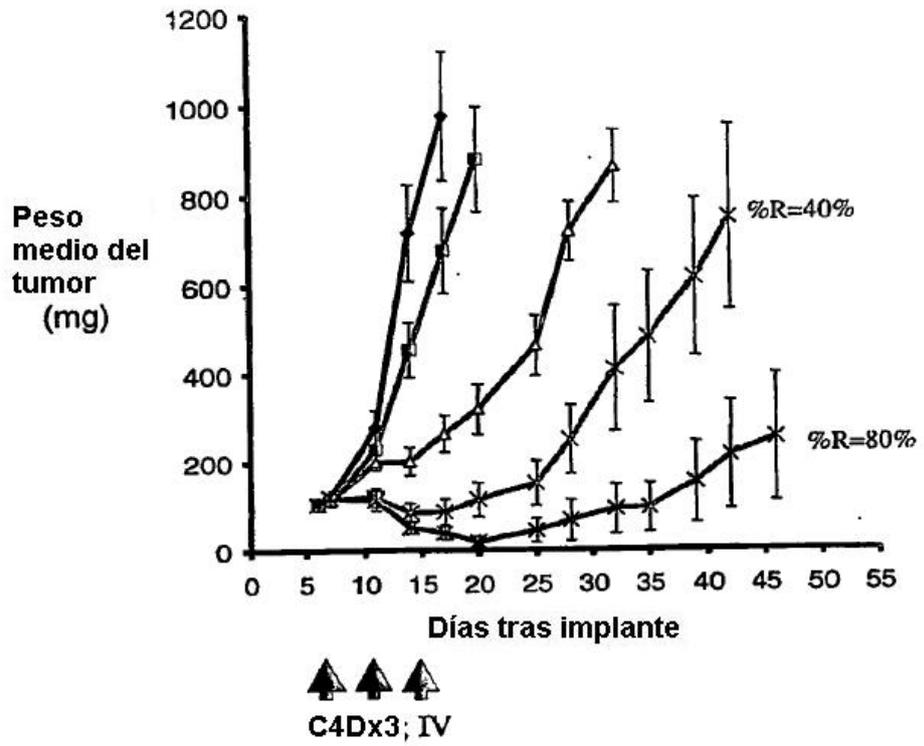


Figura 23

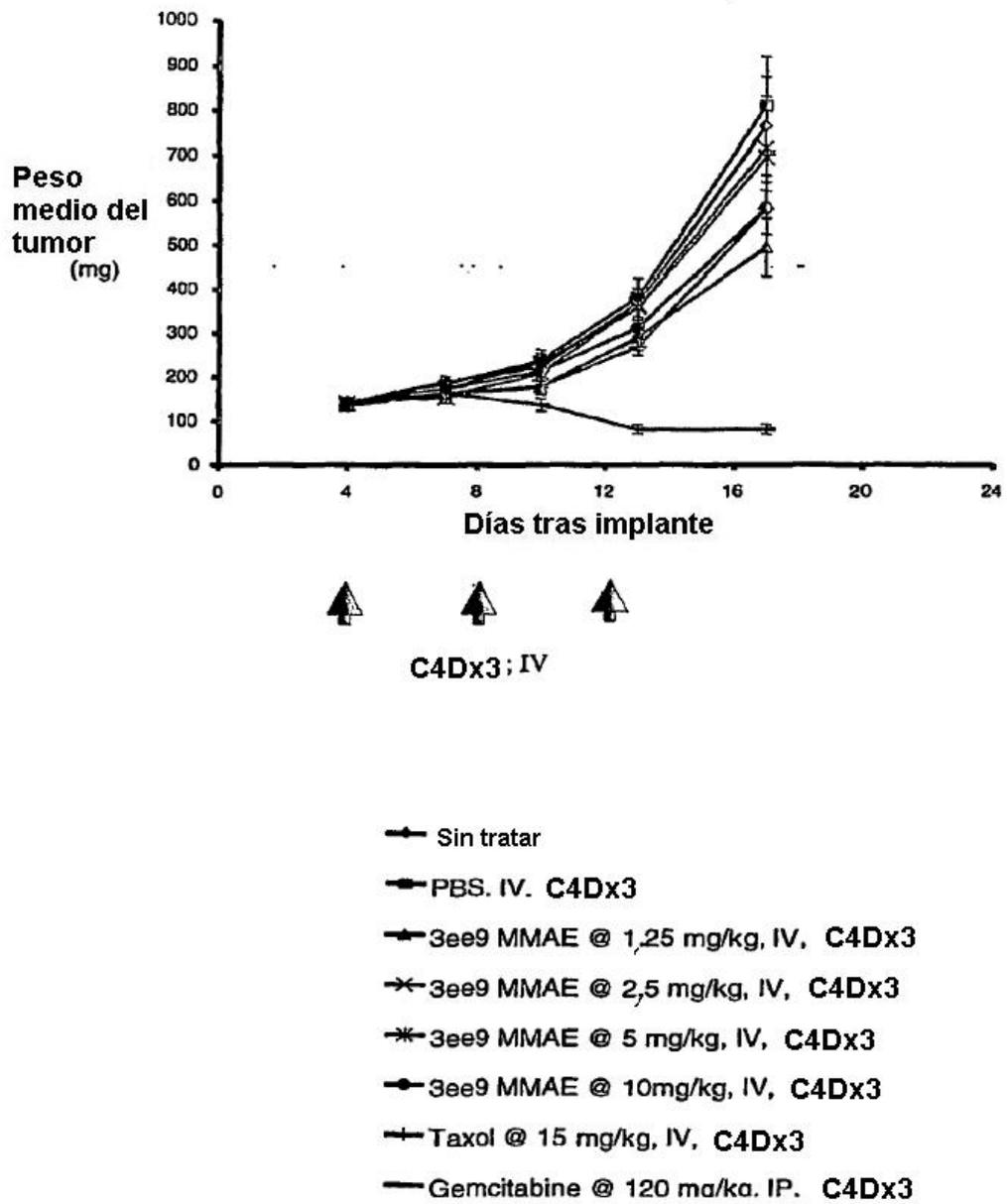


Figura 24

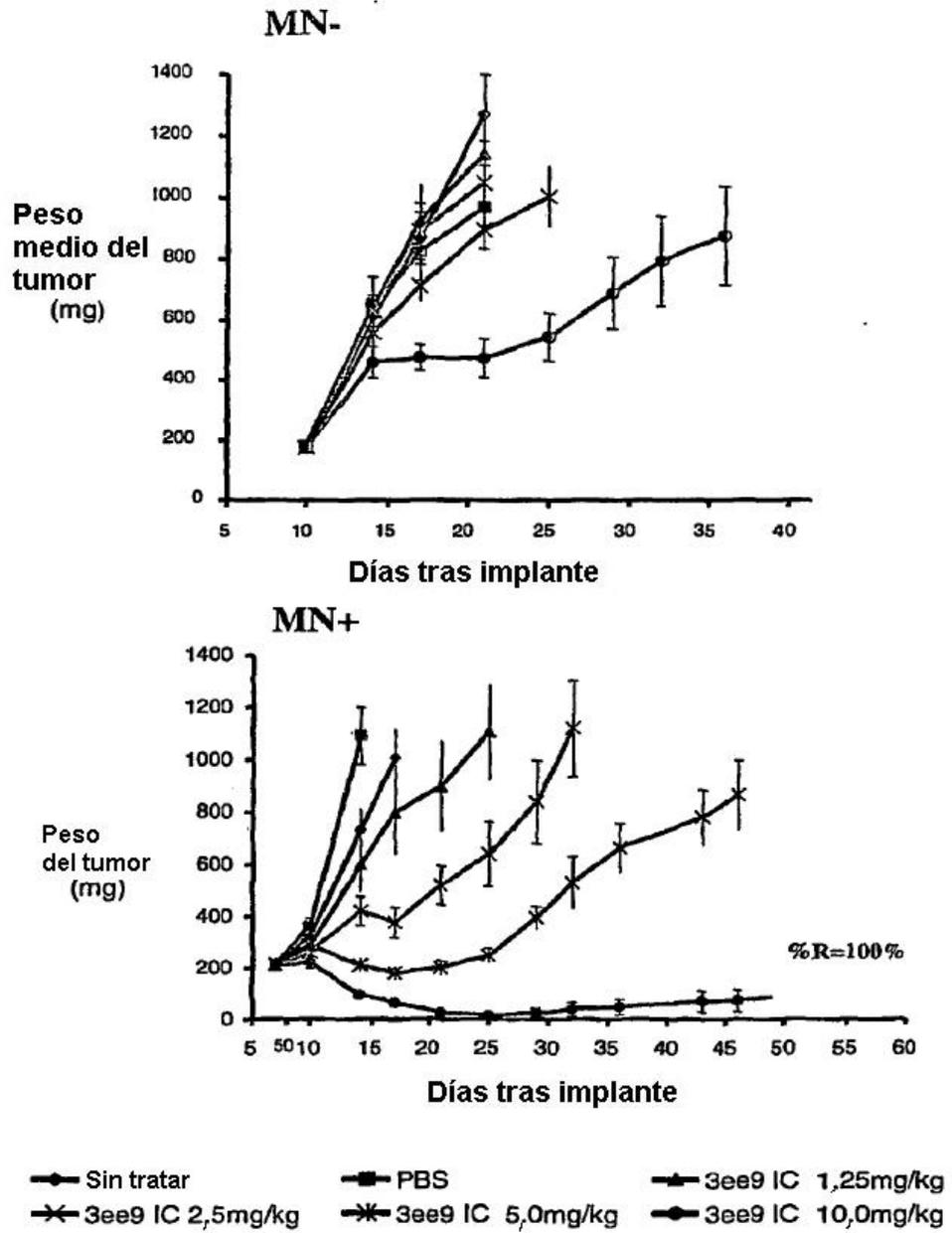


Figura 25

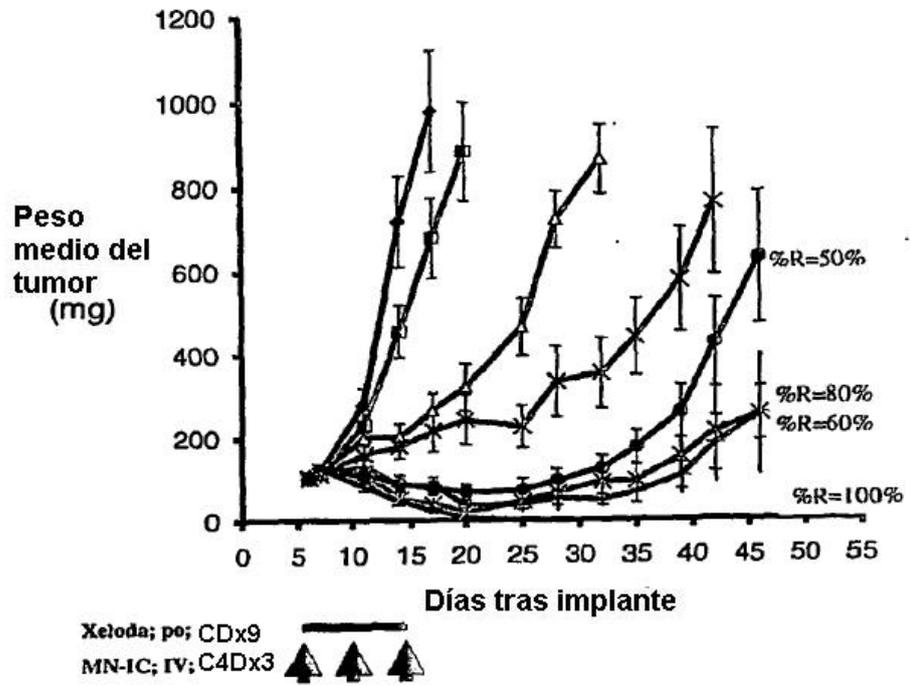
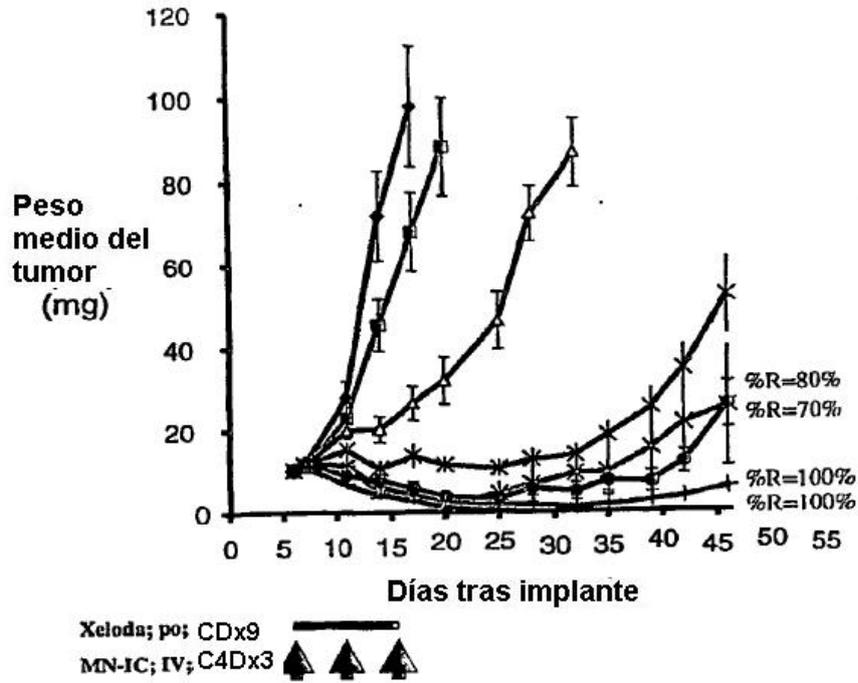


Figura 26a



- ◆— Sin tratar
- 79-4620 1,25mg/kg
- 79-4620 2,5mg/kg
- ×— 79-4620 10,0mg/kg
- *— Xeloda 500mg/kg
- ◆— 79-4620 1,25mg/kg+Xeloda 500
- +— 79-4620 2,5mg/kg+Xeloda 500
- 79-4620 10,0mg/kg+Xeloda 500

Figura 26b

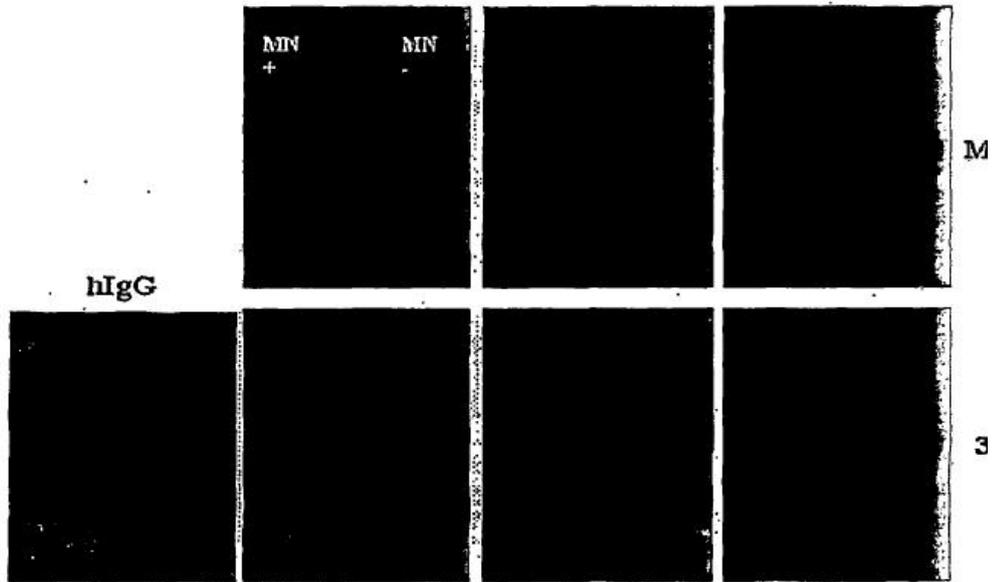


Figura 27

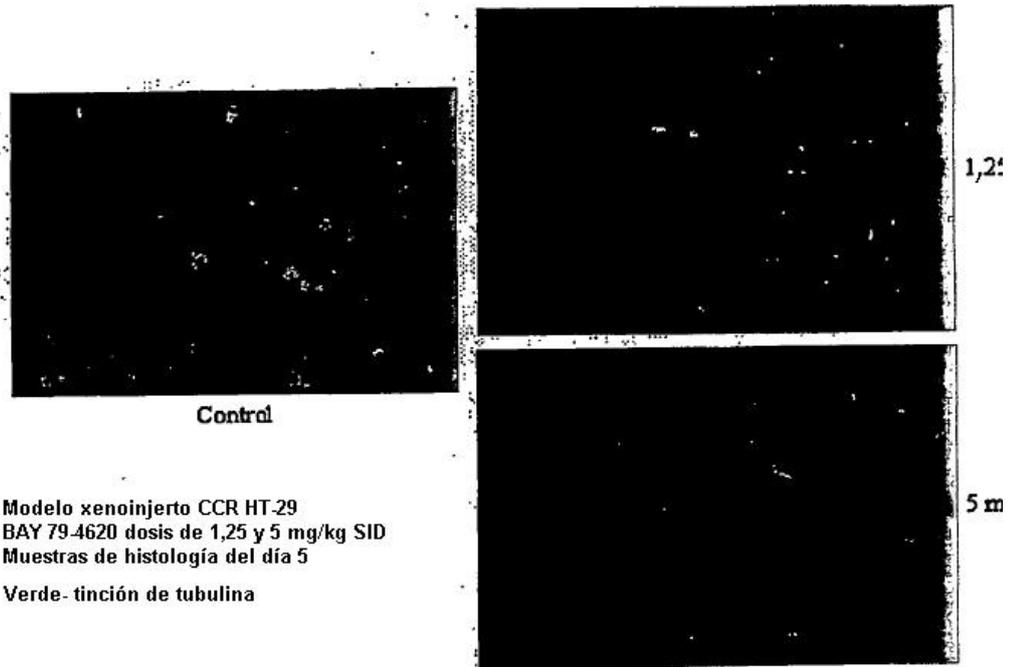


Figura 28

AATTGGAGGCTACAGTCAGTGGAGAGGACTTTCAGTACTGACTGACTGCGTCTCAACCT
 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGTCTAGAGGGCACCATGGTGTTCAGACC
 CAGGTCTTCATTTCTCTGTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGGATATCCAGATGACC
 CAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTACCTGCAGAGCG
 AGCCAGGATATTAATAAATTATCTGTCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAAA
 CTATTAATTTATGGTGTCTTAATTTGCAAAGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTAGCGGCTCT
 GGATCCGGCACTGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTT
 TATTATTGCCAGCAGTATTATGGTCGTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAA
 ATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAA
 GTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAG
 CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGTCTAAAGCAGAC
 TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
 ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGCGGCCGCGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTT
 GCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTC
 CCACTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATGTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAAT
 CTATTTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
 GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGATGCTTATCGCCACGTTTCGGCGCGCCGTC
 GACGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA
 TCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACG
 GTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACG
 TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTTGACGTCAATGGGTGGACTATTTA
 CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT
 GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
 TTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTT
 TGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCAC
 CCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT
 CGTAACAAC TCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTAT

Figura 29a

ATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAA'TTAAT
 ACGACTCAC'TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTT
 CCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGG

CGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTAC
 CTTTTCTTCTTATGGTATGCTTTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGT
 GAGCGGTATCTCTTCTTGGTAGCACTACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTT
 TACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC
 GGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACTGGTTCTCCTGGTACTTTTATGCATGG
 TGATCATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATC
 GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
 CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
 CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
 CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA
 CACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
 GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
 CAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
 TGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
 CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
 ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
 TCCGGGTAAATGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG
 CCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC
 CACTGTCTTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTC
 TATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA

Figura 29b

GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCCTCA
 CGTGGACCCAGCTTTCCTTGTACAAAGTGGTCCCCCTACAGAGACGACTGACTGACTGACT
 GGAAAGAGGAAGGGCTGGAAGAGGAAGGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
 TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
 TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
 CGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG

GAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
 GGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC
 AGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAA
 CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCA
 CAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
 GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACC GGATA
 CCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTA
 TCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA
 GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
 CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
 TGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGG
 TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG
 CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG
 AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
 CGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGAT
 CCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTC
 TGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT
 ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATC
 TGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC
 AATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTC
 CATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTT
 GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGC
 TTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGT

Figura 29c

GCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAG
 TGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCCTTACTGTCATGCCATCCGTAA
 GATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC
 GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT
 TAAAAGTGCTCATCATTTGAAAAACGTTCTTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGC
 TGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTA
 CTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAA
 TAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCA
 TTTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAC

AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTA
TTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTT
TCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTC
TGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATAAAA
TTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTT
TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGCCCGAGATAG
GGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACG
TCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAAT
CAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCC
GATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGA
AAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACAC
CCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTG
TGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAG
GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGC
GAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACG
ACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG [SEC ID N°: 153]

Figura 29d