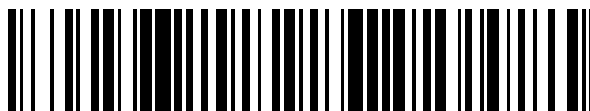


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 065**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2007 E 07814191 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2059535**

54 Título: **Anticuerpo específico para PRLR y usos del mismo**

30 Prioridad:

18.08.2006 US 838648 P
26.06.2007 US 946360 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.02.2014

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
XOMA TECHNOLOGY LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

BEDINGER, DANIEL;
DAMIANO, JASON;
LUQMAN, MOHAMMAD;
MASAT, LINDA;
MIRZA, AMER M. y
NONET, GENEVIEVE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 444 065 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

Anticuerpo específico para PRLR y usos del mismo.

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a procedimientos para prevenir y tratar cáncer administrando anticuerpos específicos para PRLR.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. Aunque "cáncer" se usa para describir muchos tipos diferentes de cáncer, es decir, mama, próstata, pulmón, colon, páncreas, cada tipo de cáncer se diferencia tanto al nivel fenotípico como al nivel genético. La característica de crecimiento sin regular del cáncer se produce cuando la expresión de uno o más genes se desregula debido a mutaciones, y el crecimiento celular ya no puede controlarse.

Los genes se clasifican frecuentemente en dos clases, oncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes son genes cuya función normal es promover el crecimiento celular, pero solo bajo condiciones específicas. Cuando un oncogén obtiene una mutación y luego pierde ese control, promueve el crecimiento bajo todas las condiciones. Sin embargo, se ha encontrado que para el cáncer es de verdad satisfactorio que el cáncer también deba adquirir mutaciones en genes supresores de tumores. La función normal de genes supresores de tumores es detener el crecimiento celular. Ejemplos de supresores tumorales incluyen p53, p16, p21 y APC, todos los cuales, cuando actúan normalmente, detienen la división y el crecimiento incontrolado de una célula. Cuando un supresor tumoral se muta o pierde, ese freno del crecimiento celular también se pierde, permitiendo que las células crezcan ahora sin limitaciones.

El receptor de prolactina (PRLR) es un receptor de citocinas de clase 1 que atraviesan una única membrana que es homólogo a receptores para miembros de la superfamilia de las citocinas, tales como los receptores para IL2, IL3, IL4, IL6, IL7, eritropoyetina y GM-CSF. PRLR participa en múltiples funciones biológicas, que incluyen crecimiento celular, diferenciación, desarrollo, lactancia y reproducción. No tiene actividad intrínseca de tirosina cinasas; la unión a ligando conduce a dimerización del receptor, fosforilación cruzada de Jak2 y señalización aguas abajo. El ADNc de receptor de prolactina humana se aisló originariamente de bibliotecas de hepatoma y cáncer de mama (Boutin, J.-M. y col., Molec. Endocr. 3: 1455-1461, 1989). La secuencia de nucleótidos predijo una proteína madura de 598 aminoácidos con un dominio citoplásmico mucho más largo que el receptor de PRL de hígado de rata. El gen del receptor de prolactina reside en la misma región cromosómica que el gen del receptor de la hormona de crecimiento, que se ha mapeado en 5;13-p12 (Arden, K. C. y col. Cytogenet. Cell Gene 53: 161-165, 1990; Arden, K.C. y col., (Resumen) AM. J. Hum. Genet. 45 (supl.): A129 solo, 1989). La hormona de crecimiento también se une al receptor de prolactina y activa el receptor.

Se ha determinado la organización genómica del gen de PRLR humano (Hu, Z.-Z. y col., J. Clin. Endocr. Metab. 84: 1153-1156, 1999). La región sin traducir 5' prima del gen de PRLR contiene 2 primeros exones alternativos: E13, el homólogo humano de E13 de rata y de ratón, y un tipo humano novedoso de primer exón alternativo llamado E1N. La región sin traducir 5' prima también contiene un exón 2 no codificante común y parte del exón 3, que contiene el codón de iniciación de la traducción. Los exones E13 y E1N están dentro de 800 pares de bases mutuamente. Estos 2 exones se expresan en tejido de mama humano, células de cáncer de mama, gónadas e hígado. En general, el transcrito que contiene E13 es predominante en la mayoría de los tejidos. El producto génico de PRLR está codificada por los exones 3-10, de los que el exón 10 codifica la mayoría del dominio intracelular. Los exones E13 y E1N se transcriben de promotores alternativos PIII y PN, respectivamente. El promotor PIII contiene elementos Sp1 y C/EBP que son idénticos a aquellos en el promotor de roedor y es el 81 % similar a la región -480/-106 en la rata y ratón. El promotor PN contiene sitios de unión putativos para las proteínas de la familia ETS y un medio sitio para receptores nucleares.

PRLR existe en varias isoformas diferentes que se diferencian en la longitud de sus dominios citoplásmicos. Se han demostrado cuatro isoformas de ARNm de PRLR (L, I, S1a y S1b) en tejido adiposo abdominal subcutáneo humano y tejido adiposo de mama (Ling, C. y col., J. Clin. Endocr. Metab. 88: 1804-1808, 2003). Además, detectaron la expresión de proteínas L-PRLR y I-PRLR en tejido adiposo abdominal subcutáneo humano y tejido adiposo de mama usando análisis de inmunotransferencia. La PRL redujo la actividad de lipoproteína lipasa en tejido adiposo humano en comparación con control. Ling y col. sugieren que estos resultados demostraron un efecto directo de PRL, mediante PRLR funcionales, en reducir la actividad de LPL en tejido adiposo humano, y que estos resultados sugirieron que LPL también podría regularse de este modo durante la lactancia. Se ha aclarado la función de estas isoformas de PRLR en rata (Perrot-Applanat, M. y col., Molec. Endocr. 11: 1020-1032, 1997). Al igual que la forma larga conocida (591 aminoácidos), la forma Nb2, que carece de 198 aminoácidos del dominio citoplásmico, puede transmitir una señal lactogénica. A diferencia, la forma corta, que carece de 291 aminoácidos del dominio citoplásmico, es inactiva. La función de la forma corta se examinó después de la cotransfección de tanto las formas largas como cortas. Estos resultados muestran que la forma corta actúa de inhibidor negativo dominante mediante la

formación de heterodímeros inactivos, produciendo la inhibición de la activación de la cinasa 2 de Janus. Perrot-Appanat y col. sugieren que la heterodimerización de PRLR puede activar positivamente o negativamente la transcripción de PRL.

5 Informes recientes han sugerido que PRLR se expresa en exceso en tejidos humanos de cáncer de mama y de
cáncer de próstata (Li y col., Cancer Res., 64:4774-4782, 2004; Gill y col., J Clin Pathol., 54:956-960, 2001; Touraine
y col., J Clin Endocrinol Metab., 83:667-674, 1998). Li y col. Informaron que la activación de Stat5 y la expresión de
PRLR está asociada a alto grado histológico en el 54 % de los especímenes de cáncer de próstata (Li y col., arriba,
10 Li y col. Oncogene 25: 1896-1902 analiza la fosforilación de PRLR en muestras de tumor). Otros informes han
sugerido que los especímenes de cáncer de mama primario son sensibles a PRL en ensayos de formación de
colonias y que las concentraciones de PRL en plasma se correlacionan con riesgo de cáncer de mama (Dosroger y
col., Cancer Res., 64:6814-6819, 2004; Dosroger y col., Cancer Res., 66:2476-2482, 2006). Otro informe indicó que
ratones transgénicos para PRL desarrollan carcinomas de mama malignos o hiperplasia de próstata (Wennbo y col.,
15 J Clin Invest., 100:2744-2751, 1997; Wennbo y col., Endocrinology, 138:4410-4415, 1997). El mAb 1167 de R&D
Systems se une a PRLR. Zhang-zhi y col., J. Biol Chem. 276: 41086 -41094 desvela un anticuerpo anti-PPLR.

Un anticuerpo monoclonal para PRLR disminuyó la incidencia de tumores mamarios en ratones (Sissom y col., Am.
J. Pathol. 133:589-595, 1988). Además, un antagonista de PRL (PRL mutante S179D) inhibió la proliferación de una
línea celular de carcinoma de próstata humano, DU-145, *in vitro* y DU-145 indujo tumores *in vivo* (Xu y col., Cancer
20 Res., 61:6098-6104, 2001).

Así, hay una necesidad de identificar composiciones y procedimientos que modulen PRLR y su función en tales
cánceres. La presente invención se refiere a estas, además de a otras, necesidades importantes.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

La secuencia de nucleótidos para PRLR se expone en SEC ID N°: 1, y la secuencia de aminoácidos se expone en
SEC ID N°: 2. El dominio extracelular (DEC) consiste en los aminoácidos 25 a 234 de SEC ID N°: 2, que puede
dividirse en dos dominios principales, S1 (aminoácidos 25-122) y S2 (aminoácidos 123-234). Se han identificado
30 varias isoformas diferentes de PRLR: larga (L), intermedia (I), Δ S1, una forma soluble inactiva (PRLBP) y formas
cortas inactivas S1a y S1b. Los exones y regiones de nucleótidos contenidos dentro de cada isoforma se muestran
en la Figura 1. En realizaciones a modo de ejemplo, la invención contempla anticuerpos que se unen al dominio S1
y/o al dominio S2. Tales anticuerpos que se unen al dominio S2 pueden elegir como diana todas las isoformas
activas. La invención también contempla anticuerpos que se unen específicamente a una isoforma y no a otra (por
35 ejemplo, intermedia y no S1a o S1b), o a las isoformas activas (larga, intermedia y Δ S1), pero no a las isoformas
inactivas (S1a y S1b).

Los materiales y procedimientos de la presente invención cumplen las necesidades anteriormente mencionadas y
otras necesidades relacionadas en la materia.

40 La invención proporciona un anticuerpo que tiene una constante de disociación en equilibrio de 10^{-6} M o inferior con
respecto a PRLR y que comprende 6 CDR, en el que:

- 45 (a) (i) CDRL1 tiene la secuencia RASKSVSTSGYTYMH;
(ii) CDRL2 tiene la secuencia LASNLES;
(iii) CDRL3 tiene la secuencia QHSGELPPS;
(iv) CDRH1 tiene la secuencia SYGMS;
(v) CDRH2 tiene la secuencia ATVSSGGTYTYYPDSVKG; y
50 (vi) CDRH3 tiene la secuencia HRGNYYATYYYAMDY; o
- (b) (i) CDRL1 tiene la secuencia KASKSVSTSGYTYMH;
(ii) CDRL2 tiene la secuencia LASNRES;
(iii) CDRL3 tiene la secuencia QHSGELPPS;
(iv) CDRH1 tiene la secuencia SYGMS;
55 (v) CDRH2 tiene la secuencia TVSSGGTYTYYPDSVKG; y
(vi) CDRH3 tiene la secuencia HRGNYYATYYYAMDY.

La invención también proporciona un procedimiento de selección de un anticuerpo para el dominio extracelular de
una proteína de PRLR útil para el tratamiento de cáncer que comprende las etapas de: poner en contacto un
60 polipéptido que comprende el DEC de PRLR con un anticuerpo candidato que contiene las 6 CDR del anticuerpo de
la invención; detectar la afinidad de unión del anticuerpo candidato por el polipéptido, e identificar dicho anticuerpo
candidato como un anticuerpo útil para el tratamiento de cáncer si se detecta una constante de disociación en
equilibrio de 10^{-6} M o inferior.

65 La invención también proporciona un procedimiento de alteración sistemática de anticuerpos y de selección de un
anticuerpo para el dominio extracelular de una proteína de PRLR útil para el tratamiento de cáncer que comprende

las etapas de: preparar un anticuerpo candidato que contiene modificaciones a uno o dos aminoácidos dentro de las CDR del anticuerpo de la invención, poner en contacto un polipéptido que comprende el DEC de PRLR con dicho anticuerpo candidato, detectar la afinidad de unión del anticuerpo candidato al polipéptido e identificar dicho anticuerpo candidato como un anticuerpo útil para el tratamiento de cáncer si se detecta una constante de disociación en equilibrio de 10^{-6} M o inferior.

La invención también proporciona un procedimiento de selección de un anticuerpo para el dominio extracelular de una proteína de PRLR útil para el tratamiento de cáncer que comprende las etapas de: poner en contacto una célula de mama, pulmón o próstata con un anticuerpo candidato que contiene las 6 CDR del anticuerpo de la invención o un anticuerpo que contiene una modificación de uno o dos aminoácidos dentro de una o más CDR; detectar la proliferación o supervivencia de dicha célula; e identificar dicho anticuerpo candidato como un anticuerpo útil para el tratamiento de cáncer si se detecta una disminución en la proliferación o supervivencia celular.

La invención también proporciona el uso del anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento para tratar un sujeto que padece cáncer.

La invención también proporciona el uso del anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento de elegir como diana una célula tumoral que expresa PRLR, en el que dicho anticuerpo está conjugado con un radionúclido u otra toxina.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo de la invención. La invención también proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención operativamente ligada a una secuencia de control reguladora.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende el vector de la invención o una molécula de ácido nucleico de la invención.

La invención también proporciona un procedimiento de uso de la célula huésped de la invención para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped de la invención bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un kit que comprende un anticuerpo de la invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, envasado en un recipiente, conteniendo dicho kit opcionalmente un segundo agente terapéutico, y que comprende además una etiqueta unida a o envasada con el recipiente, describiendo la etiqueta el contenido del recipiente y proporcionando indicaciones y/o instrucciones referentes al uso del contenido del recipiente para tratar cáncer, por ejemplo, en el que el recipiente es un vial o botella o jeringuilla precargada. Por el término "una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 10^{-6} M o inferior" se indica una constante de disociación en equilibrio de, por ejemplo, 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} M o 10^{-12} M (es decir, un número inferior a 10^{-6} M).

En otra realización, un anticuerpo anteriormente mencionado comprende una región constante de una secuencia de anticuerpo humano y una o más regiones estructurales variables de la cadena pesada y ligera de una secuencia de anticuerpo humano. En otra realización más de la invención se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado en el que la secuencia de anticuerpo humano es una secuencia humana individual, una secuencia consenso humana, una secuencia de la línea germinal humana individual o una secuencia de la línea germinal consenso humana.

En todavía otra realización se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado en el que la región constante de la cadena pesada es una IgG, IgM, IgA, IgD, IgE modificada o sin modificar, un fragmento de la misma o combinaciones de las mismas. En otra realización se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado en el que la región constante de la cadena pesada es una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificada o sin modificar. En otra realización se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado que tiene una constante de disociación en equilibrio de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ó 10^{-9} M o inferior con respecto a PRLR. En otra realización más se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado que comprende una sustitución conservativa en las CDR. En otra realización se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado que comprende un cambio conservativo o no conservativo en residuos de riesgo bajo o moderado. En todavía otra realización se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado en el que la región constante de la cadena ligera es una región constante de la cadena ligera lambda modificada o sin modificar, una región constante de la cadena ligera kappa, un fragmento de las mismas, o combinaciones de las mismas.

En otra realización más se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado que inhibe la dimerización de PRLR, inhibe la fosforilación intracelular de PRLR, inhibe la inducción de la fosforilación de MAPK, inhibe la

inducción de la fosforilación de Stat5, inhibe la inducción de la fosforilación de AKT y/o inhibe la unión de PRLR a PRLR.

En otras realizaciones, un anticuerpo anteriormente mencionado inhibe adicionalmente la producción y/o angiogénesis de VEGF.

5 En otra realización más se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado que inhibe la proliferación de una célula cancerosa. En otra realización más, el anticuerpo inhibe la proliferación de una célula de cáncer de mama, próstata o de pulmón.

10 En otra realización se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado que está conjugado con otro agente de diagnóstico o terapéutico.

En una realización se desvela en el presente documento un procedimiento para tratar un sujeto que padece cáncer, que incluye un sujeto que padece cáncer en fase 0, I, II, III, IV o V, que comprende la etapa de administrar un anticuerpo anteriormente mencionado en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización relacionada, el cáncer es cáncer de mama, pulmón o de próstata. En otra realización se administra un segundo agente terapéutico. En una realización a modo de ejemplo, el segundo agente terapéutico es doxorubicina, daunorubicina u otra antraciclina o inhibidor de topoisomerasas. En otras realizaciones, cualquiera de los anteriores inhibidores de topoisomerasas se administran con chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4. En todavía otra realización, el sujeto se trata adicionalmente con radioterapia o cirugía. En todavía otra realización, el sujeto es positivo para expresión de PRLR y expresión de HER2-neu, y en el que dicho segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-Her2-neu. En una realización relacionada, el sujeto es positivo para expresión de PRLR y expresión de ER, y en el que dicho segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-ER. La invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en medicina, que incluye para su uso en el tratamiento de un cáncer. En otras realizaciones, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer. El medicamento puede administrarse a un paciente en combinación con un segundo agente terapéutico, y/o con radioterapia.

30 En otra realización, el anticuerpo de la invención es para su uso en un procedimiento de elección como diana de una célula tumoral que expresa PRLR donde el anticuerpo se conjuga con un radionúclido u otra toxina. En otra realización, el sujeto es un mamífero. En todavía otra realización, el sujeto es un ser humano.

En todavía otra realización se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anteriormente mencionado. En todavía otra realización se proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico anteriormente mencionada operativamente ligada a una secuencia de control reguladora. En otra realización más se proporciona una célula huésped que comprende el vector anteriormente mencionado o la molécula de ácido nucleico anteriormente mencionada.

40 En todavía otra realización se proporciona un procedimiento de uso de la célula huésped anteriormente mencionada para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo. En todavía otra realización se proporciona el anticuerpo producido mediante el procedimiento anteriormente mencionado.

45 En todavía otra realización se proporciona un anticuerpo anteriormente mencionado que se purifica a al menos el 95 % de homogeneidad en peso. En otra realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anteriormente mencionado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización más se proporciona un kit que comprende un anticuerpo anteriormente mencionado que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención, envasado en un recipiente, conteniendo el kit opcionalmente un segundo agente terapéutico, y que comprende además una etiqueta unida a o envasada con el recipiente, describiendo la etiqueta el contenido del recipiente y proporcionando indicaciones y/o instrucciones referentes al uso del contenido del recipiente para tratar cáncer. En otra realización se proporciona el kit en el que el recipiente es un vial o botella o jeringuilla precargada.

55 En otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo que se une al dominio extracelular de PRLR que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 86 y 88. En otra realización se proporciona un anticuerpo que se une al dominio extracelular de PRLR que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 87, 89 y 90. En otra realización más se proporciona un anticuerpo que se une al dominio extracelular de PRLR que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de SEC ID N°: 88 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 89. En todavía otra realización se proporciona un anticuerpo que se une al dominio extracelular de PRLR que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de SEC ID N°: 88 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 90.

65 En otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo que se une al dominio extracelular de PRLR

humano con una KD de al menos 10 a 25.000 veces, 100 a 20.000 veces, 1.000 a 18.000 veces, 5.000 a 17.000 veces, 8.000 a 16.000 veces, 10.000 a 15.000 veces, 12.000 a 15.000 veces, o 13.000 a 14.000 veces, veces inferior al dominio extracelular de PRLR murino.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la disposición de genes y exones en diversas isoformas de PRLR.

Las **Figuras 2, 3 y 4** muestran el efecto de anticuerpos específicos para PRLR seleccionados sobre la fosforilación de pERK1/2. [mAb 1167 es un anticuerpo monoclonal anti-PRLR murino de control; R&D Systems, nº de catálogo MAB 1167]

La **Figura 5** muestra el efecto de anticuerpo específico para PRLR sobre la proliferación de una línea celular tumoral sensible a PRL.

La **Figura 6** muestra el efecto de anticuerpo específico para PRLR sobre la fosforilación intracelular de PRLR.

La **Figura 7A-7C** muestra las secuencias de aminoácidos de VH y VL, además de la localización de las CDR (subrayadas), de anticuerpos XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239 que tuvieron más del 80 % de inhibición en el ensayo de pERK.

La **Figura 8** muestra la secuencia de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo XPA.06.145.

La **Figura 9** muestra las secuencias de nucleótidos conductoras y de VH y VL de anticuerpos XHA.06.983, XHA.06.275 y XHA.06.642.

La **Figura 10** muestra las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos XHA.06.983, XHA.06.275 y XHA.06.642 (CDR subrayadas).

La **Figura 11** muestra que los mAb anti-PRLR quiméricos chXHA.06.642, chXHA.06.275 y chXHA.06.983 inhiben potentemente la proliferación y supervivencia de células BaF/PRLR. KLH-G1 es un anticuerpo de control del mismo isotipo no específico. El panel a la derecha muestra valores de CI_{50} de mAb de ratón correspondientes.

La **Figura 12** muestra que mAb anti-PRLR quiméricos inhiben la señalización de STAT5 en células T47D. Las células se pretrataron con 1 ug/ml de mAb antes de la estimulación de 30 min con 50 ng/ml de PRL. Los lisados se analizaron para la presencia de fosfo-PRLR usando anticuerpos específicos para los residuos de fosfotirosina 546 y 611 de PRLR.

La **Figura 13** muestra el efecto de anticuerpos Human Engineered™ sobre la fosforilación de pERK1/2.

La **Figura 14** muestra ADCC mediada por mAb anti-PRLR quiméricos. Células T47D-T2 se marcaron con calceína-AM antes de la aplicación de mAb (1 ug/ml) y células NK humanas purificadas a una relación de efector con respecto a diana de 10:1. Tras 4 h de incubación se midió la liberación de calceína-AM en el sobrenadante. Se usaron anticuerpo anti-KLH y Herceptin como controles negativos y positivos, respectivamente. El % de lisis específica se calculó como (liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea) X 100.

La **Figura 15** muestra que mAb anti-PRLR sinergizan con fármacos citotóxicos en estudios de combinación. Se coadministraron doxorubicina (panel superior) y cisplatino (panel inferior) con Ab de control anti-KLH, mAb anti-PRLR chXHA.06.642 o mAb anti-PRLR chXHA.06.275 (todos a 1 ug/ml). Se determinó la supervivencia de células por análisis CellTiterGlo y se informa como URL (eje y).

La **Figura 16** muestra que mAb Human Engineered™ retienen características funcionales de anti-PRLR en ensayos de fosforilación de STAT5. Se incubaron células T47D con 1 ó 10 ug/ml de mAb, luego se trataron con o sin PRL (50 ng/ml) durante 30 min adicionales.

Las **Figuras 17A y B** muestran que candidatos a anticuerpos anti-PRLR humanizados inhiben potentemente el crecimiento de células BaF3/PRLR dependiente de PRL. Se cultivaron células BaF3/PRLR en presencia de PRL (50 ng/ml) durante 48 h con tanto anticuerpo de control anti-KLH (línea superior), anticuerpo quimérico como versiones de Human Engineered™. Se calcularon valores de CE_{50} usando análisis de regresión no lineal de los ajustes a curva.

Las **Figuras 18A y B** muestran la inhibición de p-STAT5 en tumores Nb2-C11 de animales tratados con chXHA.06.642. Se inyectaron intraperitonealmente ratones atímicos con tumores Nb2-c11 subcutáneos con

chXHA.06.642 o mAb IgG1 de control KLH. Dos días después se administró una inyección intraperitoneal en bolo de 20 ug de oPRL. Se inyectaron animales de control con solución salina. Dos días después se administró intraperitonealmente una inyección en bolo de 20 ug de oPRL, y 40 minutos después los tumores se recogieron y se evaluaron para p-STAT5 por inmunotransferencia o IHC. Fig. 18A, transferencia Western de 80 ug de Tyr694 p-STAT5: Fig. 18B, IHC de Tyr694 p-STAT5.

Las **Figuras 19A y B** muestran que chXHA.06.642 es eficaz en el modelo de linfoma de rata Nb2-c11 en ratones SCID en dos estudios diferentes.

Las **Figuras 20A y B** muestran que chXHA.06.642 revierte tumores de linfoma de rata Nb2-C11 establecidos en ratones SCID. La Fig. 20A muestra el volumen de tumor; la Fig. 20B muestra la supervivencia condicional.

Las **Figuras 21A y B** muestran que la inyección en bolo intraperitoneal de oPRL induce p-STAT5, y el tratamiento con chA64.1 inhibe la inducción de p-STAT5 en xenoinjertos de mama humana T47D. Se inyectaron intraperitonealmente chXHA.06.642 o IgG1 de control KLH en ratones inmunodeprimidos que llevan tumores T47D implantado con 0,18 mg/día de pellas de estradiol (E₂) para soportar el crecimiento. Dos días después se administró intraperitonealmente una inyección en bolo de 20 ug de oPRL, y 40 minutos después los tumores T47D se recogieron y se evaluaron para p-STAT5 por inmunotransferencia o IHC. También se evaluaron los niveles de p-ERK o p-AKT por inmunotransferencia. Fig. 21A, Transferencia Western de 80 ug de Tyr694 p-STAT5; Fig. 21B, IHC de Tyr694 p-STAT5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona anticuerpos específicos para PRLR, formulaciones farmacéuticas que contienen tales anticuerpos, procedimientos de preparación de los anticuerpos y formulaciones farmacéuticas, y procedimientos para tratar pacientes con las formulaciones farmacéuticas y compuestos. Los anticuerpos según la presente invención pueden tener una actividad biológica deseada de unión a PRLR y/o inhibición de la dimerización de PRLR y/o inhibición de la fosforilación intracelular de PRLR y/o inhibición de la señalización aguas abajo de PRLR, por ejemplo, mediante fosforilación de Jak2, Mapk, Stat5, Erk1/2 y/o Akt, e inhibición de la proliferación celular asociada a cáncer o tumores. De esta forma se contempla el análisis directo de la activación de PRLR por detección de su fosforilación o evaluando el estado de fosforilación de otros componentes de señalización aguas abajo tales como Jak2, Stat5, Erk1/2 y/o Akt. Así, el análisis de rutas de señalización aguas abajo puede usarse para identificar pacientes en necesidad de anticuerpos anti-PRLR o usarse para monitorizar pacientes que han sido tratados con anticuerpos anti-PRLR.

Los anticuerpos según la presente invención pueden tener alternativamente (o además) una actividad biológica deseada de unión a PRLR expresado sobre células cancerosas, sirviendo así para elegir como diana terapias citotóxicas para las células cancerosas.

La invención se refiere además a ensayos de selección para identificar antagonistas o agonistas de un gen de PRLR o producto génico y variantes de los mismos. Así, la invención se refiere a procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un gen de PRLR o producto génico y variantes de los mismos, y el uso de dicho agonista o antagonista para tratar o prevenir cáncer como se describe en el presente documento. Adicionalmente, la presente invención contempla el uso de las moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos y/o antagonistas o agonistas de productos génicos codificados por un gen de PRLR para seleccionar, diagnosticar, prevenir y/o tratar trastornos caracterizados por expresión o actividad anómala de PRLR, que incluyen, cánceres, tales como, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, mama y próstata.

Varios anticuerpos murinos o quiméricos preferidos con alta afinidad y potencia como se mide por ensayos *in vitro* se modifican para ser menos inmunogénicos en seres humanos basándose en el procedimiento Human Engineering™ de Studnicka y col. Brevemente, residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se modifican a residuos humanos en posiciones que se ha determinado que es poco probable que afecten adversamente tanto la unión a antígeno como el plegamiento de proteínas, mientras que reducen su inmunogenicidad con respecto a un entorno humano. Se construyen genes sintéticos que contienen regiones variables de la cadena pesada y/o ligera modificadas y se ligan a regiones constantes humanas de la cadena pesada y/o cadena ligera kappa. Cualquier región constante humana de la cadena pesada y la cadena ligera puede usarse en combinación con las regiones variables de anticuerpos Human Engineered™. Los genes de la cadena pesada y ligera humanos se introducen en células de mamífero y se obtienen y caracterizan los productos de inmunoglobulina recombinantes resultantes.

Anticuerpos a modo de ejemplo desvelados en el presente documento incluyen chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 y XHA.06.907. Los

siguientes hibridomas secretores de anticuerpos se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (EE.UU.), conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest, el 17 de agosto de 2006:

<u>NOMBRE DEL HIBRIDOMA</u>	<u>NUMERO DE DEPOSITO ATCC</u>
XHA.06.567	PTA-7794
XHA.06.642	PTA-7795
XHA.06.983	PTA-7796
XHA.06.275	PTA-7797
XHA.06.189	PTA-7798
XHA.06.907	PTA-7799

Las definiciones a continuación se proporcionan como una ayuda para entender más completamente la invención.

Definiciones generales

El antígeno diana "PRLR" humano como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido humano que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que SEC ID N°: 2 y variantes alélicas y/o de corte y empalme que se producen naturalmente del mismo. "DEC de PRLR" como se usa en el presente documento se refiere a la porción extracelular de PRLR representada por los aminoácidos 25 a 234 de SEC ID N°: 2.

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer linfático, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino o cáncer de piel.

"Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere a tanto tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, además de aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. En el tratamiento de tumores (por ejemplo, cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de células tumorales, o hacer las células tumorales más susceptibles a tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia. El tratamiento de pacientes que padecen síntomas clínicos, bioquímicos, radiológicos o subjetivos de la enfermedad puede incluir aliviar algunos o todos de aquellos síntomas o reducir la predisposición a la enfermedad. La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o no controlable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anormales, supresión o agravamiento de respuesta inflamatoria o inmunológica, etc. Así, la mejora después del tratamiento puede manifestarse como una disminución en el tamaño del tumor, descenso en la tasa de crecimiento tumoral, destrucción de células tumorales o células metastásicas existentes, y/o una reducción en el tamaño o número de metástasis.

"Mamífero" para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es humano.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende referirse a una cantidad de anticuerpo terapéutico o profiláctico que sería apropiada para una realización de la presente invención, que provocará el efecto o respuesta terapéutico o profiláctico deseado, que incluye aliviar algunos o todos de aquellos síntomas de enfermedad o reducir la predisposición a la enfermedad, cuando se administran según la pauta de tratamiento deseada.

Anticuerpos

La "afinidad" o "afinidad de unión" se miden frecuentemente por la constante de asociación en equilibrio (K_A) o la constante de disociación en equilibrio (K_D). El término "inmunoespecífico" o "que se une específicamente" significa que el anticuerpo se une a PRLR o su DEC con una constante de asociación en equilibrio (K_A) superior a o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} , superior a o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} , superior a o igual a aproximadamente 10^8

M^{-1} , o superior a o igual a aproximadamente $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$ o $10^{12} M^{-1}$. El anticuerpo puede tener afinidad sustancialmente mayor por el antígeno diana en comparación con otras moléculas sin relacionar. El anticuerpo también puede tener afinidad sustancialmente mayor por el antígeno diana en comparación con ortólogos u homólogos, por ejemplo, al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces o mayor afinidad relativa por el antígeno diana. Alternativamente, podría ser útil que el anticuerpo reaccionara de forma cruzada con un homólogo u ortólogo conocido.

Los anticuerpos de la invención también pueden caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio (K_D) $10^{-4} M$, $10^{-6} M$ a $10^{-7} M$, o $10^{-8} M$, $10^{-10} M$, $10^{-11} M$ o $10^{-12} M$ o inferior. Tales afinidades pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, tales como por diálisis en equilibrio; usando el instrumento BIAcore 2000, usando procedimientos generales brevemente explicados por el fabricante; por radioinmunoensayo usando antígeno diana radiomarcado; o por otro procedimiento conocido para el experto. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el procedimiento de Scatchard y col., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949).

Por “anticuerpo neutralizante” se indica una molécula de anticuerpo que puede eliminar o reducir significativamente una función efectora de un antígeno diana con el que se une. Por consiguiente, un anticuerpo anti-diana “neutralizante” puede eliminar o reducir significativamente una función efectora, tal como actividad enzimática, unión a ligando o señalización intracelular.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab)2, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos), cuerpos de camello y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores en tanto que presenten la actividad biológica deseada. Los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos y se describen adicionalmente más adelante. Ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales incluyen inmunoglobulinas murinas, quiméricas, humanizadas, humanas y Human Engineered™, anticuerpos, proteínas de fusión quiméricas que tienen secuencias derivadas de inmunoglobulinas, o muteínas o derivados de las mismas, cada uno descrito adicionalmente más adelante. Se contemplan multímeros o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos, que incluyen anticuerpos químicamente derivatizados. Según la presente invención se contemplan anticuerpos de cualquier clase o subclase de isotipo.

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo homogéneo, sin contaminar por otras inmunoglobulinas, con diferentes especificidades y características.

El adjetivo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 [1975], o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden ser, por ejemplo, recombinantes, quiméricos, humanizados, humanos, Human Engineered™, o fragmentos de anticuerpos.

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo como se ha determinado por el procedimiento de Lowry, y lo más preferentemente más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N o secuencia de aminoácidos interna por el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Una “inmunoglobulina” o “anticuerpo nativo” es una glucoproteína tetramérica. En una inmunoglobulina que se produce naturalmente, cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región “variable” de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. La porción del extremo carboxi de cada cadena define

una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (Δ), gamma (γ), alfa (α) y épsilon (ϵ) y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases o isotipos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de ADCC. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ). Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase generalmente *Fundamental Immunology*, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Para una descripción detallada de la estructura y generación de anticuerpos véase Roth, D.B., y Craig, N.L., *Cell*, 94:411-414 (1998). Brevemente, el procedimiento para generar ADN que codifica los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera se produce principalmente en linfocitos B en desarrollo. Antes del reordenamiento y unión de diversos segmentos de genes de inmunoglobulina, los segmentos de genes V, D, J y constantes (C) se encuentran generalmente a relativa proximidad sobre un único cromosoma. Durante la diferenciación de linfocitos B, uno de cada uno de los miembros de la familia apropiada de los segmentos de genes V, D, J (o solo V y J en el caso de genes de la cadena ligera) se recombinan para formar genes de inmunoglobulina pesada y ligera funcionalmente reordenados. Este proceso de reordenamiento de segmentos de genes parece ser secuencial. Primero se hacen las uniones D a J de la cadena pesada, seguido de las uniones V a DJ de la cadena pesada y las uniones V a J de la cadena ligera. Además del reordenamiento de segmentos V, D y J, adicionalmente se genera diversidad en el repertorio primario de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina a modo de recombinación variable en las localizaciones en las que los segmentos V y J en la cadena ligera se unen y en las que los segmentos D y J de la cadena pesada se unen. Tal variación en la cadena ligera normalmente se produce dentro del último codón del segmento del gen V y el primer codón del segmento J. Imprecisión similar en la unión se produce en el cromosoma de la cadena pesada entre los segmentos D y J_H y puede extenderse durante hasta 10 nucleótidos. Además, pueden insertarse varios nucleótidos entre los segmentos de genes D y J_H y entre V_H y D que no están codificados por ADN genómico. La adición de estos nucleótidos se conoce como diversidad de la región N. El efecto neto de tales reordenamientos en los segmentos de genes de la región variable y la recombinación variable que puede producirse durante tal unión es la producción de un repertorio de anticuerpos primarios.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa intacto (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanos), preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto, e incluyen anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpo de dominio (dAb), fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos lineales (Zapata y col., *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995)); anticuerpos recombinantes quelantes, tricuerpos o bicuerpos, intracuerpos, nanocuerpos, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), una proteína de fusión de dominio de unión a antígeno-inmunoglobulina, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene VHH, o muteínas o derivados de las mismas, y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión de antígeno específica al polipéptido, tal como una secuencia de CDR, en tanto que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab')₂ que tiene dos fragmentos "Fv". Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH VL. Conjuntamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno.

Fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenario" o "sFv" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido de Fv comprende además un polipéptido ligador entre los dominios VH y VL que permite que Fv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 1 13, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se diferencian de fragmentos Fab' mediante la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron

originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos.

El término región "hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o CDR [es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] y/o aquellos residuos de un bucle hipervariable (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por [Chothia y col., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)].

Residuos de la "región estructural" o FR son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable.

El término "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras.

El término "anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene secuencia derivada de dos anticuerpos diferentes (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.816.567) que normalmente se originan a partir de diferentes especies. Lo más normalmente, los anticuerpos quiméricos comprenden fragmentos de anticuerpos humanos y murinos, generalmente regiones constantes humanas y variables de ratón.

Los términos "muteína" o "variante" pueden usarse indistintamente y se refieren a la secuencia de polipéptidos de un anticuerpo que contiene al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos en la región variable o la porción equivalente a la región variable, a condición de que la muteína o variante retenga la afinidad de unión deseada o actividad biológica. Las muteínas pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas al anticuerpo parental.

El término "derivado" cuando se usa a propósito de los anticuerpos de la invención se refiere a anticuerpos covalentemente modificados por técnicas tales como ubiquitinación, conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcado (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión covalente de polímeros tal como PEGilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos no naturales. Los derivados de la invención retendrán las propiedades de unión de moléculas sin derivatizar de la invención.

Cuando se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye específicamente uno cualquiera de los siguientes que retienen la capacidad para unirse a la porción extracelular de PRLR:

1) una muteína de aminoácido de un anticuerpo parental que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 7A-7C o Figura 8, que incluye muteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable que es al menos el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o el 99 % homóloga a la secuencia de aminoácidos parental, y/o que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable que es al menos el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o el 99 % homóloga a la secuencia de aminoácidos parental, teniendo en cuenta aminoácidos similares para la determinación de la homología;

2) polipéptidos de unión a PRLR que comprenden una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo parental que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 7A-7C o Figura 8, que comprenden preferentemente al menos CDR3 de la cadena pesada, y que comprenden preferentemente dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o las seis CDR;

3) anticuerpos Human Engineered™ generados alterando la secuencia parental según los procedimientos expuestos en Studnicka y col., patente de EE.UU. n° 5.766.886 y el Ejemplo 5 en el presente documento, usando la numeración de Kabat para identificar residuos de riesgo bajo, moderado y alto; comprendiendo tales anticuerpos al menos una de las siguientes cadenas pesadas y al menos una de las siguientes cadenas ligeras: (a) una cadena pesada en la que todos los residuos de roedor de riesgo bajo que se diferencian de residuos correspondientes en una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana se han modificado para ser los mismos que los residuos humanos en la secuencia de inmunoglobulina de referencia humana o (b) una cadena pesada en la que todos los residuos de roedor de riesgo bajo y moderado se han modificado, si fuera necesario, para ser los mismos residuos que en la secuencia de inmunoglobulina de referencia humana, (c) una cadena ligera en la que todos los residuos de riesgo bajo se han modificado, si fuera necesario, para ser los mismos residuos que una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana o (b) una cadena ligera en la que todos los residuos de riesgo bajo y moderado se han modificado, si fuera necesario, para ser los mismos residuos que una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana;

4) muteínas de los anticuerpos anteriormente mencionados en el párrafo (3) precedente que comprenden una cadena pesada o ligera o regiones variables de la cadena pesada o ligera que tienen al menos el 60 % de identidad de secuencias de aminoácidos con la cadena ligera de roedor original, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, y lo más preferentemente al menos el 95 %, que incluyen, por ejemplo, el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 %.

90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y el 100 % de identidad;

5) polipéptidos de unión a PRLR que comprenden los residuos de riesgo alto de una o más CDR del anticuerpo de roedor, y que comprenden preferentemente residuos de riesgo alto de dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o las seis CDR, y que opcionalmente comprenden uno o más cambios en los residuos de riesgo bajo o moderado;

por ejemplo, que comprende uno o más cambios en un residuo de riesgo bajo y sustituciones conservativas en un residuo de riesgo moderado, o

por ejemplo, que retiene los residuos de aminoácidos de riesgo moderado y alto y que comprende uno o más cambios en un residuo de riesgo bajo,

en el que los cambios incluyen inserciones, deleciones o sustituciones y pueden ser sustituciones conservativas o pueden hacer que el anticuerpo manipulado esté más próximo en secuencia a una secuencia de cadena ligera o cadena pesada humana, una secuencia de la cadena ligera o cadena pesada de la línea germinal humana, una secuencia de la cadena ligera o cadena pesada humana consenso o una secuencia de la cadena ligera o cadena pesada de la línea germinal humana consenso. Tales cambios contemplados también pueden mostrarse en formato de secuencia del siguiente modo. En una secuencia hipotética de AKKLVHTPYSFKEDF, en la que el riesgo respectivo asignado a cada residuo según Studnicka y col., patente de EE.UU. nº 5.766.886, es HMLHMLHMLHMLHML (H= alto, M= medio, L= bajo), cambios a modo de ejemplo a los residuos de riesgo bajo de la secuencia hipotética pueden expresarse como: AKXLVXTPTSFXEDX en la que X es cualquier aminoácido, o alternativamente en la que X es una sustitución conservativa del residuo original en esa posición, y cambios a modo de ejemplo para los residuos de riesgo bajo y moderado pueden expresarse similarmente, por ejemplo, AYXLYXTYXSXEYX, en la que X es cualquier aminoácido e Y es una sustitución conservativa del residuo original en esa posición.

El término "anticuerpo de competición" incluye

1) un anticuerpo monoclonal no murino o de no roedor que se une al mismo epítipo de PRLR que el anticuerpo chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 o XHA.06.907, por ejemplo, como se ha determinado por cristalografía de rayos X; y/o

2) un anticuerpo monoclonal no murino o de no roedor que compite con el anticuerpo chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 o XHA.06.907, más del 75 %, más del 80 %, o más del 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o el 95 %; alternativamente, un anticuerpo monoclonal no murino o de no roedor que reduce la unión de chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 o XHA.06.907 al menos 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 100 veces o más. En una realización, el anticuerpo monoclonal no murino o de no roedor está en un exceso molar de 50 veces.

Los anticuerpos de la invención se unen preferentemente al DEC de PRLR con una constante de disociación en equilibrio de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o inferior y preferentemente inhiben la fosforilación intracelular de PRLR y la activación de la señalización de PRLR aguas abajo, por ejemplo, mediante la activación de STAT5, MAPK o AKT.

Opcionalmente, cualquier anticuerpo humanizado quimérico, humano o públicamente desvelado antes de la fecha de presentación del presente documento, o desvelado en una solicitud presentada antes de la fecha de presentación del presente documento, se excluye del alcance de la invención.

Anticuerpo monoclonal de "no roedor" es cualquier anticuerpo, como se ha definido ampliamente en el presente documento, que no es un anticuerpo monoclonal de roedor intacto completo generado por un hibridoma de roedor. Así, anticuerpos de no roedor incluyen específicamente, pero no se limitan a, muteínas de anticuerpos de roedor, fragmentos de anticuerpos de roedor, anticuerpos lineales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos Human Engineered™ y anticuerpos humanos, que incluyen anticuerpos humanos producidos a partir de

animales transgénicos o mediante tecnología de expresión en fago. Similarmente, los anticuerpos no murinos incluyen, pero no se limitan a, muteínas de anticuerpos de roedor, fragmentos de anticuerpos de roedor, anticuerpos lineales, anticuerpos quiméricos, humanizados, Human Engineered™ y humanos.

5 **Antígeno diana**

El antígeno diana que va a usarse para la producción de anticuerpos pueden ser, por ejemplo, la porción extracelular de PRLR, o un fragmento que retiene el epítipo deseado, opcionalmente fusionado con otro polipéptido que permite que el epítipo se exprese en su conformación nativa. Alternativamente, PRLR intacto expresado en la superficie de células puede usarse para generar anticuerpos. Tales células pueden transformarse para expresar PRLR o pueden ser otras células que se producen naturalmente que expresan PRLR. Otras formas de polipéptidos de PRLR útiles para generar anticuerpos serán evidentes para aquellos expertos en la materia.

15 **Anticuerpos policlonales**

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Una respuesta de anticuerpos mejorada puede obtenerse conjugando el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugación a residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a {fracción (1/10)} de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. A los 7-14 días después de la inyección de refuerzo, los animales se sangran y el suero se ensaya para título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjuga con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Por tanto, agentes de agregación tales como alumbre se usan adecuadamente para potenciar la respuesta inmunitaria.

35 **Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante.

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza como se ha descrito en el presente documento para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)), o pueden fusionarse usando fusión en Electrocult.

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Líneas de mieloma murino a modo de ejemplo incluyen aquellas derivadas de los tumores de ratón MOP-21 y M.C.-11 disponibles del Centro de distribución de células del Instituto Salk, San Diego, Calif. EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. EE.UU.

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por análisis de Scatchard (Munson y col., Anal. Biochem.,

107:220 (1980)).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tal como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse a partir de células de hibridoma usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). La determinación de secuencias generalmente requerirá el aislamiento de al menos una parte del gen o ADNc de interés. Normalmente, esto requiere clonar el ADN o, preferentemente, ARNm (es decir, ADNc) que codifica los anticuerpos monoclonales. La clonación se lleva a cabo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press). Por ejemplo, puede construirse una biblioteca de ADNc por transcripción inversa de ARNm poliA+, preferentemente ARNm asociado a la membrana, y seleccionarse la biblioteca usando sondas específicas para secuencias de genes de polipéptidos de inmunoglobulina humana. Sin embargo, en una realización preferida, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para amplificar ADNc (o porciones de ADNc de longitud completa) que codifican un segmento del gen de inmunoglobulina de interés (por ejemplo, un segmento variable de la cadena ligera). Las secuencias amplificadas pueden clonarse fácilmente en cualquier vector adecuado, por ejemplo, vectores de expresión, vectores de minigen o vectores de expresión en fago. Se apreciará que el procedimiento particular de clonación usado no es crítico, mientras que sea posible determinar la secuencia de alguna porción del polipéptido de inmunoglobulina de interés. Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "aislada" o secuencia de ácidos nucleicos "aislada" es una molécula de ácido nucleico que o bien (1) se identifica o se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está generalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico o bien (2) se clona, amplifica, marca o distingue de otro modo de ácidos nucleicos de referencia de forma que la secuencia del ácido nucleico de interés pueda determinarse, se considera aislada. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o ámbito en el que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que generalmente expresan el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

Una fuente para ARN usada para la clonación y secuenciación es un hibridoma producido obteniendo un linfocito B del ratón transgénico y fusionando el linfocito B con una célula inmortal. Una ventaja del uso de hibridomas es que pueden seleccionarse fácilmente, y seleccionarse un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano de interés. Alternativamente, el ARN puede aislarse de linfocitos B (o bazo completo) del animal inmunizado. Si se usan fuentes distintas de hibridomas, puede desearse seleccionar secuencias que codifican inmunoglobulinas o polipéptidos de inmunoglobulina con características de unión específica. Un procedimiento para tal selección es el uso de tecnología de expresión en fago. La expresión en fago se describe en, por ejemplo, Dower y col., documento WO 91/17271, McCafferty y col., documento WO 92/01047, y Caton y Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6450-6454 (1990). En una realización usando tecnología de expresión en fago, ADNc de un ratón transgénico inmunizado (por ejemplo, ADNc de bazo total) se aísla, se usa la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar secuencias de ADNc que codifican una parte de un polipéptido de inmunoglobulina, por ejemplo, regiones CDR, y las secuencias amplificadas se insertan en un vector de fago. ADNc que codifican péptidos de interés, por ejemplo, péptidos de la región variable con características de unión deseadas, se identifican por técnicas convencionales tales como inmunopurificación.

Entonces se determina la secuencia del ácido nucleico amplificado o clonado. Normalmente se determina la secuencia que codifica una región variable entera del polipéptido de inmunoglobulina; sin embargo, algunas veces será adecuado secuenciar solo una parte de una región variable, por ejemplo, la parte codificante de CDR. Normalmente, la porción secuenciada tendrá al menos 30 bases de longitud, más frecuentemente se secuenciarán bases que codifican al menos aproximadamente un tercio o al menos aproximadamente la mitad de la longitud de la región variable.

La secuenciación puede llevarse a cabo en clones aislados de una biblioteca de ADNc o, si se usa PCR, después de subclonar la secuencia amplificada o por secuenciación de PCR directa del segmento amplificado. La secuenciación se lleva a cabo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, vol 1-3, Cold Spring Harbor Press, y Sanger, F. y col. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467). Comparando la secuencia del ácido nucleico clonado con secuencias publicadas de genes de inmunoglobulina humana y ADNc, un experto podrá determinar fácilmente, dependiendo de la región secuenciada, (i) el uso del segmento de la línea germinal del polipéptido de inmunoglobulina de hibridoma (incluyendo el isotipo de

la cadena pesada) y (ii) la secuencia de las regiones variables de cadena pesada y ligera, que incluyen secuencias resultantes de la adición de la región N y el procedimiento de mutación somática. Una fuente de información de secuencias del gen de inmunoglobulina es el Centro nacional para información biotecnológica, Biblioteca Nacional de Medicina, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

Fragmentos de anticuerpos

Como se observa anteriormente, los fragmentos de anticuerpos comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa intacto, preferentemente una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto, e incluyen anticuerpos lineales y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, anticuerpo de dominio (dAb), fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos recombinantes quelantes, tricuerpos o bicuerpos, intracuerpos, nanocuerpos, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), una proteína de fusión de dominio de unión a antígeno-inmunoglobulina, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene VHH, o muteínas o derivados de las mismas, y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido, tal como una secuencia de CDR, en tanto que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada. Tales fragmentos de antígeno pueden producirse por la modificación de anticuerpos completos o sintetizarse *de novo* usando tecnologías de ADN recombinante o síntesis de péptidos.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable (V_H) de las cadenas pesadas conectado a un dominio variable (V_L) de las cadenas ligeras en la misma cadena de polipéptidos (V_H - V_L). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y 30 Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L, estando estos dominios presentes en una única cadena de polipéptidos, y comprendiendo opcionalmente un ligador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que Fv forme la estructura deseada para la unión a antígeno (Bird y col., Science 242:423-426, 1988, y Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Un fragmento Fd consiste en los dominios V_H y C_{H1}.

Fragmentos de anticuerpos adicionales incluyen un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward y col., Nature 341:544-546, 1989) que consiste en un dominio V_H.

Los "anticuerpos lineales" comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos (Zapata y col. Protein Eng. 8:1057-62 (1995)).

Un "minicuerpo" que consiste en scFv fusionado con CH3 mediante un péptido ligador (sin bisagra) o mediante una bisagra de IgG se ha descrito en Olafsen, y col., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17(4):315-23.

Anticuerpos de la cadena pesada funcionales que carecen de cadenas ligeras se producen naturalmente en tiburones gata (Greenberg y col., Nature 374:168-73, 1995), tiburones alfombra (Nuttall y col., Mol Immunol. 38:313-26, 2001) y *Camelidae* (Hamers-Casterman y col., Nature 363: 446-8, 1993; Nguyen y col., J. Mol. Biol. 275: 413, 1998), tales como camellos, dromedarios, alpacas y llamas. El sitio de unión a antígeno se reduce a un único dominio, el dominio V_{HH}, en estos animales. Estos anticuerpos forman regiones de unión a antígeno usando solo la región variable de la cadena pesada, es decir, estos anticuerpos funcionales son homodímeros de cadenas pesadas que solo tienen la estructura H₂L₂ (denominados "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAbs"). V_{HH} camelizado se recombina supuestamente con regiones constantes de IgG2 y IgG3 que contienen dominios bisagra, CH2 y CH3 y carecen de un dominio CH1 (Hamers-Casterman y col., arriba). Por ejemplo, IgG1 de llama es un isotipo de anticuerpo convencional (H₂L₂) en el que V_H se recombina con una región constante que contiene dominios bisagra, CH1, CH2 y CH3, mientras que las IgG2 y IgG3 de llama son solo isotipos de cadena pesada que carecen de dominios CH1 y que no contienen cadenas ligeras. Solo los fragmentos V_H clásicos son difíciles de producir en forma soluble, pero pueden obtenerse mejoras en la solubilidad y la unión específica cuando los residuos de la región estructural se alteran para ser más similares a V_{HH} (véase, por ejemplo, Reichman y col., J Immunol Methods 1999, 231:25-38.) Se ha encontrado que los dominios V_{HH} camelizados se unen a antígeno con alta afinidad (Desmyter y col., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001) y poseen alta estabilidad en disolución (Ewert y col., Biochemistry 41:3628-36, 2002). Los procedimientos para generar anticuerpos que tienen cadenas pesadas camelizadas se describen en, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. nº 20050136049 y 20050037421.

Debido a que el dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada es el fragmento de unión a antígeno completamente funcional más pequeño con una masa molecular de solo 15 kDa, esta entidad se denomina un

nanocuerpo (Cortez-Retamozo y col., Cancer Research 64:2853-57, 2004). Puede generarse una biblioteca de nanocuerpos a partir de un dromedario inmunizado como se describe en Conrath y col., (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001) o usando procedimientos recombinantes como se describen en

Los intracuerpos son anticuerpos monocatenarios que demuestran expresión intracelular y pueden manipular la función de proteínas intracelulares (Biocca, y col., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004). Los intracuerpos, que comprenden secuencias señal de células que retienen la construcción de anticuerpo en regiones intracelulares, pueden producirse como se describe en Mhashilkar y col. (EMBO J 14:1542-51, 1995) y Wheeler y col. (FASEB J. 17:1733-5. 2003). Los transcuerpos son anticuerpos permeables a células en los que un dominio de transducción de proteínas (PTD) está fusionado con anticuerpos de fragmentos variables monocatenarios (scFv) Heng y col., (Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005).

Adicionalmente se contemplan anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina específicas para proteína diana. Estas construcciones son polipéptidos monocatenarios que comprenden dominios de unión a antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo las funciones efectoras de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, el documento WO03/041600, la publicación de patente de EE.UU. 20030133939 y la publicación de patente de EE.UU. 20030118592.

Anticuerpos multivalentes

En algunas realizaciones puede desearse generar anticuerpo monoclonal multivalente o incluso uno multiespecífico (por ejemplo, biespecífico, triespecífico, etc.). Tal anticuerpo puede tener especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes del antígeno diana, o alternativamente puede unirse a dos moléculas diferentes, por ejemplo, al antígeno diana y a una proteína de la superficie celular o receptor. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede incluir un brazo que se une a la diana y otro brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (Fc γ R), tales como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16), de manera que se centren los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa diana. Como otro ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan antígeno diana. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a diana y un brazo que se une a agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-60, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos multiespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

Según otro enfoque para preparar anticuerpos biespecíficos, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidas con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Véase el documento WO96/27011 publicado el 6 de septiembre de 1996.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan y col., Science 229:81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas. Better y col., Science 240: 1041-1043 (1988) desvelan la secreción de fragmentos de anticuerpos funcionales de bacterias (véanse, por ejemplo, Better y col., Skerra y col. Science 240: 1038-1041 (1988)). Por ejemplo, fragmentos de Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992); Shalaby y col., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)).

Shalaby y col., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico

completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado podía unirse a células que expresaban en exceso el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, además de provocar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina, por ejemplo, GCN4 (véase generalmente Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase, Gruber y col., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Alternativamente, el anticuerpo biespecífico puede ser un "anticuerpo lineal" producido como se describe en Zapata y col. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos (Tutt y col., *J. Immunol.* 147:60 (1991)).

Un "anticuerpo recombinante quelante" es un anticuerpo biespecífico que reconoce epítopes adyacentes y no solapantes del antígeno diana, y es suficientemente flexible para unirse a ambos epítopes simultáneamente (Neri y col., *J Mol Biol.* 246:367-73, 1995).

La producción de Fab-scFv biespecífico ("bicuerpo") y Fab-(scFv)₂ triespecífico ("tricuerpo") se describe en Schoonjans y col. (*J Immunol.* 165:7050-57, 2000) y Willems y col. (*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786:161-76, 2003). Para bicuerpos o tricuerpos, una molécula de scFv se fusiona con una o ambas de las cadenas de VL-CL (L) y VH-CH₁ (Fd), por ejemplo, para producir un tricuerpo dos scFv se fusionan con el extremo C de Fab mientras que en un bicuerpo un scFv se fusiona con el extremo C de Fab.

Producción recombinante de anticuerpos

Los anticuerpos pueden producirse por metodología de ADN recombinante usando uno de los sistemas de expresión de anticuerpos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

Los anticuerpos que codifican ADN de la invención pueden colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células 293 de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293E), células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos es muy conocida en la técnica. Se han derivado fragmentos de anticuerpos mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan y col., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora producirse directamente por células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos, que incluyen síntesis de péptidos y enlace covalente, serán evidentes para el médico habitual.

Secuencias de control de la expresión se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está operativamente ligado cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente ligado a ADN para un

polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. Generalmente, operativamente ligado significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La ligación se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos se usan según la práctica convencional.

Célula, línea celular y cultivo celular se usan frecuentemente indistintamente y todas aquellas designaciones en el presente documento incluyen progenie. Los transformantes y células transformadas incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma sin considerar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Está incluida la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se ha seleccionado en la célula originalmente transformada. Si se prevén distintas designaciones, será evidente del contexto.

En una realización alternativa, la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina de interés puede determinarse por secuenciación directa de proteínas. Pueden diseñarse secuencias de nucleótidos codificantes adecuadas según una tabla de codones universal.

Las muteínas de secuencias de aminoácidos del anticuerpo deseado pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, o por síntesis de péptidos. Tales muteínas incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procedimientos postraduccionales del anticuerpo monoclonal, humano, humanizado, Human Engineered™ o de muteína, tal como cambiando el número o posición de sitios de glucosilación.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican muteínas de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de muteínas de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una muteína preparada antes o una versión de no muteína del anticuerpo.

La invención también proporciona ácido nucleico aislado que codifica anticuerpos de la invención, opcionalmente operativamente ligado a secuencias de control reconocidas por una célula huésped, vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos, y técnicas recombinantes para la producción de los anticuerpos, que pueden comprender cultivar la célula huésped de manera que el ácido nucleico se exprese y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped o medio de cultivo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico codificante se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores selectivos, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(1) Componente de la secuencia señal

El anticuerpo de la presente invención puede producirse recombinantemente no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Si las células huésped procariotas no reconocen y procesan la secuencia señal del anticuerpo nativo, la secuencia señal puede sustituirse con una secuencia señal seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de peptato liasa (por ejemplo, pelB) fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina estable al calor II. Para la secreción de levadura, la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de levadura invertasa, líder de factor α (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO90/13646. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, además de líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN para tal región precursora se liga en marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(2) Componente de origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias autónomamente replicantes. Tales secuencias son muy conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido 2 μ es adecuado para levadura, y son útiles diversos orígenes virales para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 puede usarse normalmente solo debido a que contiene el promotor temprano).

(3) Componente de marcador selectivo

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen selectivo, también llamado un marcador de selección. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, tetraciclina, G418, geneticina, histidinol o ácido micofenólico (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son satisfactoriamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y así sobrevive la pauta de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos metotrexato, neomicina, histidinol, puromicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para capturar el ácido nucleico que codifica anticuerpo, tal como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

Alternativamente, las células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo de la invención, proteína DHFR natural y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. nº 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano. Similarmente, cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 ó 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*. Cepas de levadura deficientes en *Ura3* se complementan por plásmidos que llevan el gen *ura3*.

Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Alternativamente se informó de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina bovina recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de albúmina de suero humano recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Flier y col., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

(4) Componente de promotor

Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente ligado al ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de arabinosa (por ejemplo, *araB*) promotor *phoA*, sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada al ADN que codifica el anticuerpo de la invención.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases en la dirección 5' del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. También se usan ventajosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de la leucemia de Abelson, virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, lo más preferentemente citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de EE.UU. nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. nº 4.601.978. Véase también Reyes y col., Nature 297:598-601 (1982) que describe la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, como promotor puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(5) Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores aumenta frecuentemente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) que describe elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo, pero preferiblemente está localizado en un sitio 5' desde el promotor.

(6) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, hongo, insecto, planta, animal, humana o nucleada de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones sin traducir de 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariotas o virales o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en su interior. Otro es el terminador de la transcripción de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón.

(7) Selección y transformación de células huésped

Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en este documento son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, además de *Bacilli* tales como *B.*

subtilis y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41 P de *B. licheniformis* desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como B de *E. coli*, X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537) y W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de planta y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para transfección está públicamente disponible, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células de planta de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, tabaco, leña y otras células de planta como huéspedes.

Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son células de ovario de hámster chino, que incluyen células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, y células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, [Graham y col., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)]; células de riñón de bebé de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-11587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W 138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman o transfectan con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Además, vectores novedosos y líneas celulares transfectadas con múltiples copias de unidades de transcripción separadas por un marcador selectivo son particularmente útiles y se prefieren para la expresión de anticuerpos.

(8) Cultivo de células huésped

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem. 102:255 (1980), las patentes de EE.UU. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO90103430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. nº 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamycin™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto habitual en la técnica.

(9) Purificación de anticuerpos

Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio, que incluye de cultivos microbianos. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como fragmentos lisados, se elimina, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Better y col. Science 240: 1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10: 105 (1990); y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 457-461 (1993) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. (véase también [Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)]).

La composición de anticuerpo preparada a partir de células microbianas o de mamífero puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

Anticuerpos quiméricos

Un anticuerpo de roedor con administración *in vivo* repetida en el hombre bien solo o bien como un conjugado provocará una respuesta inmunitaria en el receptor contra el anticuerpo de roedor; la llamada respuesta de HAMA (anticuerpo humano anti-ratón). La respuesta de HAMA puede limitar la eficacia del producto farmacéutico si se requiere dosificación repetida. La inmunogenicidad del anticuerpo puede reducirse por modificación química del anticuerpo con un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol o usando procedimientos de ingeniería genética para hacer la estructura del anticuerpo más similar a la humana, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o Human Engineered™. Debido a que tales anticuerpos manipulados son menos inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos monoclonales de ratón parentales, pueden usarse para el tratamiento de seres humanos con mucho menos riesgo de anafilaxia. Así, estos anticuerpos pueden preferirse en aplicaciones terapéuticas que implican administración *in vivo* a un ser humano.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos, en los que los dominios Ig variables de un anticuerpo monoclonal de ratón están fusionados con dominios Ig constantes humanos, pueden generarse usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica (véanse Morrison, S. L., y col. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; y, Boulianne, G. L., y col., Nature 312, 643-646. (1984)). Por ejemplo, las secuencias de gen para los dominios variables del anticuerpo de roedor que se unen a CEA pueden sustituirse por los dominios variables de una proteína de mieloma humana, produciendo así un anticuerpo quimérico recombinante. Estos procedimientos se detallan en los documentos EP 194276, EP 0120694, EP 0125023, EP 0171496, EP 0173494 y WO 86/01533. Aunque algunos anticuerpos monoclonales quiméricos han demostrado ser menos inmunogénicos en seres humanos, los dominios Ig variables de ratón pueden todavía conducir a una respuesta humana anti-ratón significativa.

Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos humanizados pueden lograrse mediante una variedad de procedimientos que incluyen, por ejemplo: (1) injertar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en una región estructural humana y región constante (un procedimiento denominado en la materia humanizar mediante "injerto de CDR"), o, alternativamente, (2) trasplantar los dominios variables no humanos enteros, pero "encubriéndolos" con una superficie similar a humana mediante sustitución de residuos superficiales (un procedimiento denominado en la materia "inactivación"). En la presente invención, los anticuerpos humanizados incluirán tanto anticuerpos "humanizados" como "inactivados". Estos procedimientos se desvelan en, por ejemplo, Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer y col., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994); y Kettleborough, C.A. y col., Protein Eng. 4(7):773-83 (1991).

Por ejemplo, las secuencias de genes de las CDR del anticuerpo de roedor pueden aislarse o sintetizarse y

sustituirse con las regiones de secuencia correspondientes de un gen de anticuerpo humano homólogo, produciendo un anticuerpo humano con la especificidad del anticuerpo de roedor original. Estos procedimientos se describen en los documentos EP 023940, WO 90/07861 y WO91/09967.

El injerto de CDR implica introducir una o más de las seis CDR de los dominios de Ig variables de la cadena pesada y ligera de ratón en las cuatro regiones estructurales apropiadas de dominios de Ig variables humanos también se llama injerto de CDR. Esta técnica (Riechmann, L., y col., Nature 332, 323 (1988)), utiliza las regiones estructurales conservadas (FR1-FR4) como un esqueleto para soportar los bucles de CDR que son los contactos primarios con el antígeno. Sin embargo, una desventaja del injerto de CDR es que puede producir un anticuerpo humanizado que tiene una afinidad de unión sustancialmente inferior a la del anticuerpo de ratón original, debido a que los aminoácidos de las regiones estructurales pueden contribuir a la unión a antígeno, y debido a que los aminoácidos de los bucles de CDR pueden influir en la asociación de los dos dominios de Ig variables. Para mantener la afinidad del anticuerpo monoclonal humanizado, la técnica de injerto de CDR puede mejorarse eligiendo regiones estructurales humanas que se parecen mucho a las regiones estructurales del anticuerpo de ratón original, y por mutagénesis dirigida a sitio de aminoácidos individuales dentro de la región estructural o CDR ayudadas por modelado informático del sitio de unión a antígeno (por ejemplo, Co, M. S., y col. (1994), J. Immunol. 152, 2958-2976).

Un procedimiento de humanización de anticuerpos comprende alinear las secuencias de cadenas pesadas y ligeras no humanas con secuencias de cadenas pesadas y ligeras humanas, seleccionar y sustituir la región estructural no humana con una región estructural humana basándose en tal alineamiento, modelar molecularmente para predecir la conformación de la secuencia humanizada y comparar con la conformación del anticuerpo parental. Este procedimiento va seguido de retromutación repetida de residuos en la región CDR que alteran la estructura de las CDR hasta que la conformación predicha del modelo de secuencia humanizado se aproxime mucho a la conformación de las regiones no humanas del anticuerpo parental no humano. Tales anticuerpos humanizados pueden derivatizarse adicionalmente para facilitar la captación y eliminación, por ejemplo, mediante receptores Ashwell (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.530.101 y 5.585.089).

Se ha informado de varias humanizaciones de anticuerpos monoclonales de ratón por diseño racional (véase, por ejemplo, el documento 20020091240 publicado el 11 de julio de 2002, documento WO 92/11018 y la patente de EE.UU. nº 5.693.762, la patente de EE.UU. nº 5.766.866).

Anticuerpos Human Engineered™

El término "anticuerpo Human Engineered™" se refiere a un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo monoclonal de ratón. Alternativamente, un anticuerpo Human Engineered™ puede derivarse de un anticuerpo quimérico que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo no humano parental, pero que presenta inmunogenicidad disminuida con respecto al anticuerpo parental cuando se administra a seres humanos.

Se han descrito Human Engineering™ de dominios variables de anticuerpos por Studnicka [véanse, por ejemplo, Studnicka y col., patente de EE.UU. nº 5.766.886; Studnicka y col. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] como un procedimiento para reducir la inmunogenicidad mientras que se mantiene la actividad de unión de moléculas de anticuerpo. Según el procedimiento, a cada aminoácido de la región variable se le ha asignado un riesgo de sustitución. Las sustituciones de aminoácidos se distinguen por una de las tres categorías de riesgo: (1) cambios de riesgo bajo son aquellos que tienen la mayor probabilidad de reducir la inmunogenicidad con la mínima posibilidad de alterar la unión a antígeno; (2) cambios de riesgo moderado son aquellos que reducirían adicionalmente la inmunogenicidad, pero tienen una mayor posibilidad de afectar la unión a antígeno o el plegamiento de proteínas; (3) residuos de riesgo alto son aquellos que son importantes para la unión o para mantener la estructura del anticuerpo y llevan el mayor riesgo de que se afecte la unión a antígeno o plegamiento de proteínas. Debido a la función estructural tridimensional de prolinas, las modificaciones en prolinas se consideran generalmente que son al menos cambios de riesgo moderado, aunque la posición sea normalmente una posición de riesgo bajo.

Regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo de roedor son Human Engineered™ del siguiente modo para sustituir aminoácidos humanos en posiciones que se determina que es poco probable que efectúen adversamente tanto la unión a antígeno como el plegamiento de proteínas, pero que probablemente reducen la inmunogenicidad en un entorno humano. Se identifican residuos de aminoácidos que están en posiciones "de riesgo bajo" y que son candidatos para modificación según el procedimiento alineando las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de roedor con una secuencia de la región variable humana. Puede usarse cualquier región variable humana, que incluye una secuencia de VH o VL individual o una secuencia de VH o VL consenso humana o una secuencia de la línea germinal humana individual o consenso. Pueden cambiarse residuos de aminoácidos en cualquier número de las posiciones de riesgo bajo, o en todas las posiciones de riesgo bajo. Por ejemplo, en cada posición de riesgo bajo en la que los residuos de aminoácidos murinos y humanos alineados se diferencian se introduce una modificación de aminoácidos que sustituye el residuo de roedor con el residuo humano. Alternativamente pueden cambiarse los residuos de aminoácidos en todas las posiciones de riesgo bajo y en cualquier número de las posiciones de riesgo moderado. Idealmente, para lograr la menor inmunogenicidad, todas

las posiciones de riesgo bajo y moderado se cambian de secuencia de roedor a humana.

Se construyen genes sintéticos que contienen regiones variables de cadena pesada y/o ligera modificadas y se ligan a regiones constantes de la cadena pesada y/o de la cadena ligera kappa humanas. Cualquier región constante de la cadena pesada y de la cadena ligera humana puede usarse en combinación con las regiones variables del anticuerpo Human Engineered™, que incluyen IgA (de cualquier subclase, tal como IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (de cualquier subclase, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), o IgM. Los genes de la cadena pesada y ligera humana se introducen en células huésped, tales como células de mamífero, y se obtienen y caracterizan productos de inmunoglobulina recombinantes resultantes.

Anticuerpos humanos de animales transgénicos

Los anticuerpos humanos para antígeno diana también pueden producirse usando animales transgénicos que no tienen producción de inmunoglobulina endógena y se manipulan para contener sitios de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, el documento WO 98/24893 desvela animales transgénicos que tienen un sitio de Ig humana en el que los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de sitios endógenos de la cadena pesada y ligera. El documento WO 91/10741 también desvela huéspedes mamíferos no primates transgénicos que pueden organizar una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, en los que los anticuerpos tienen regiones constantes y/o variables de primate, y en los que los sitios que codifican inmunoglobulina endógena están sustituidos o inactivados. El documento WO 96/30498 desvela el uso del sistema Cre/Lox para modificar el sitio de inmunoglobulina en un mamífero, tal como para sustituir toda o una parte de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificada. El documento WO 94/02602 desvela huéspedes mamíferos no humanos que tienen sitios de Ig endógenos inactivados y sitios de Ig humanos funcionales. La patente de EE.UU. nº 5.939.598 desvela procedimientos de preparación de ratones transgénicos en los que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas, y expresan un sitio de inmunoglobulina exógeno que comprende una o más regiones constantes xenogéneas.

Usando un animal transgénico descrito anteriormente, una respuesta inmunitaria puede producirse para una molécula antigénica seleccionada, y pueden extraerse células productoras de anticuerpo del animal y usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos de inmunización, adyuvantes y similares se conocen en la técnica, y se usan en la inmunización de, por ejemplo, un ratón transgénico como se describe en el documento WO 96/33735. Esta publicación desvela anticuerpos monoclonales contra una variedad de moléculas antigénicas que incluyen IL-6, IL-8, TNF α , CD4 humano, L-selectina, gp39 y toxina tetánica. Los anticuerpos monoclonales pueden probarse para la capacidad para inhibir o neutralizar la actividad biológica o efecto fisiológico de la proteína correspondiente. El documento WO 96/33735 desvela que los anticuerpos monoclonales contra IL-8, derivada de células inmunitarias de ratones transgénicos inmunizados con IL-8, bloquearon las funciones inducidas por IL-8 de neutrófilos. Anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por el antígeno usado para inmunizar animales transgénicos también se desvelan en el documento WO 96/34096 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030194404; y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030031667). Véanse también Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993); y la patente de EE.UU. nº 5.591.669, la patente de EE.UU. nº 5.589.369, la patente de EE.UU. nº 5.545.807; y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20020199213, documento WO 96/34096 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030194404; y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030031667.

Animales transgénicos adicionales útiles para preparar anticuerpos monoclonales incluyen Medarex HuMAb-MOUSE®, descrito en la patente de EE.UU. nº 5.770.429, y Fishwild y col. (Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996), que contiene secuencias de genes de genes de anticuerpos humanos sin reordenar que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos. La inmunización de un HuMAb-MOUSE® permite la producción de anticuerpos monoclonales para la proteína diana.

Por tanto, Ishida y col. (Cloning Stem Cells. 4:91-102, 2002) describen el ratón TransChromo (TCMOUSE™) que comprende segmentos de megabases de tamaño de ADN humano y que incorpora el sitio de la inmunoglobulina humana (hlg) entera. El TCMOUSE tiene un repertorio completamente diverso de hlg, que incluye todas las subclases de IgG (IgG1-G4). La inmunización del ratón TC con diversos antígenos humanos produce respuestas de anticuerpos que comprenden anticuerpos humanos.

La solicitud de patente de EE.UU. nº 20030092125 describe procedimientos para sesgar la respuesta inmunitaria de un animal al epítopo deseado. También pueden generarse anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.567.610 y 5.229.275).

Anticuerpos de tecnología de expresión en fago

El desarrollo de tecnologías para preparar repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes, y la expresión de los fragmentos de anticuerpos codificados sobre la superficie de bacteriófago filamentoso, ha proporcionado un medio recombinante para preparar y seleccionar directamente anticuerpos humanos, que también puede aplicarse a anticuerpos humanizados, quiméricos, murinos o de muteína. Los anticuerpos producidos por la

tecnología de fagos se producen como fragmentos de unión a antígeno - normalmente fragmentos Fv o Fab - en bacterias y así carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras pueden introducirse por una de las dos estrategias: los fragmentos pueden manipularse tanto en anticuerpos completos para la expresión en células de mamífero como en fragmentos de anticuerpos biespecíficos con un segundo sitio de unión que puede provocar una función efectora.

Normalmente, el fragmento Fd (V_H - C_H1) y la cadena ligera (V_L - C_L) de anticuerpos se clonan por separado por PCR y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas combinatorias de expresión en fago, que pueden entonces seleccionarse para unirse a un antígeno particular. Los fragmentos Fab se expresan sobre la superficie del fago, es decir, se ligan físicamente a los genes que los codifican. Así, la selección de Fab por unión a antígeno co-selecciona las secuencias codificantes de Fab, que pueden amplificarse posteriormente. Por varias rondas de unión a antígeno y re-amplificación, un procedimiento llamado inmunopurificación, Fab específico para el antígeno se enriquece y finalmente se aísla.

En 1994 se describió un enfoque para la humanización de anticuerpos, llamado "selección guiada". La selección guiada utiliza la potencia de la expresión en la técnica en fagos para la humanización de anticuerpo monoclonal de ratón (véase Jespers, L. S., y col., *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)). Para esto, el fragmento Fd del anticuerpo monoclonal de ratón puede expresarse en combinación con una biblioteca de cadenas ligeras humanas, y la biblioteca de Fab híbrida resultante puede entonces seleccionarse con antígeno. El fragmento Fd de ratón proporciona así un molde para guiar la selección. Posteriormente, las cadenas ligeras humanas seleccionadas se combinan con una biblioteca de fragmentos Fd humanos. La selección de la biblioteca resultante proporciona Fab completamente humano.

Se ha descrito una variedad de procedimientos para derivar anticuerpos humanos de bibliotecas de expresión en fago (véanse, por ejemplo, Hoogenboom y col., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); las patentes de EE.UU. n° 5.565.332 y 5.573.905; Clackson, T., y Wells, J. A., *TIBTECH* 12, 173-184 (1994)). En particular, la selección y evolución *in vitro* de anticuerpos derivados de bibliotecas de expresión en fago se ha convertido en una poderosa herramienta (véanse Burton, D. R., y Barbas III, C. F., *Adv. Immunol.* 57, 191-280 (1994); y, Winter, G., y col., *Annu. Rev. Immunol.* 12,433-455 (1994); solicitud de patente de EE.UU. n° 20020004215 y el documento WO92/01047; solicitud de patente de EE.UU. n° 20030190317 publicada el 9 de octubre de 2003 y la patente de EE.UU. n° 6.054,287; la patente de EE.UU. n° 5.877.293.

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries por Capture Lift", *Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols* 178: 187-193, y la solicitud de patente de EE.UU. n° 200120030044772 publicada el 6 de marzo de 2003, describen procedimientos para seleccionar bibliotecas de anticuerpos expresadas en fago u otras moléculas de unión por levantamiento por captura, un procedimiento que implica la inmovilización de las moléculas de unión candidatas sobre un soporte sólido.

Los productos de anticuerpo pueden seleccionarse para actividad y para idoneidad en los procedimientos de tratamiento de la invención usando ensayos como se describen en la sección titulada "Procedimientos de selección" en el presente documento o usando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica.

Muteínas de secuencias de aminoácidos

Los anticuerpos de la invención incluyen muteína o variantes de un anticuerpo parental en el que la secuencia de polipéptidos del anticuerpo parental ha sido alterada por al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos en la región variable o la porción equivalente a la región variable, que incluye dentro de las CDR, a condición de que la muteína o variante retenga la afinidad de unión deseada o actividad biológica. Las muteínas pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas al anticuerpo parental, por ejemplo, al menos el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % idénticas u homólogas. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a la secuencia parental, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencias. Ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones del extremo N, extremo C o internas en la secuencia de anticuerpos debe interpretarse como que afecta la identidad de secuencias u homología. Así, la identidad de secuencias puede determinarse mediante procedimientos convencionales que se usan comúnmente para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Usando un programa informático tal como BLAST o FASTA, dos polipéptidos se alinean para correspondencia óptima de sus aminoácidos respectivos (tanto a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias como a lo largo de una porción predeterminada de una o ambas secuencias). Los programas proporcionan una penalización por apertura por defecto y una penalización por hueco por defecto, y puede usarse una matriz de puntuación tal como PAM 250 [una matriz de puntuación estándar; véase Dayhoff y col., en *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, sup. 3 (1978)] conjuntamente con el programa informático. Por ejemplo, la identidad en porcentaje puede entonces calcularse como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100 y luego dividirse entre la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro de la amplitud de coincidencia y el número de huecos introducidos en las

secuencias más largas con el fin de alinear las dos secuencias.

Los anticuerpos de la invención también pueden incluir alteraciones en la secuencia de polipéptidos de la región constante, que no afectarán la afinidad de unión, pero pueden alterar la función efectora, tal como toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o eliminación y captación (y efecto resultante sobre la semivida).

Inserciones

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del extremo amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cientos o más residuos, además de inserciones intra-secuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples, por ejemplo 2, 3 o más. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo del extremo N o el anticuerpo (incluyendo fragmento de anticuerpo) fusionado con una marca de epítipo o un epítipo de receptor salvaje. Otras muteínas de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la adición de sitios de glucosilación, adición de cisteínas para enlace intramolecular o intermolecular, o fusión con un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo, por ejemplo, en el extremo N o extremo C. Por ejemplo, el (los) enlace(s) de cisteína puede(n) añadirse al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

La glucosilación de anticuerpos está normalmente tanto ligada en N como ligada en O. Ligada en N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina en las que X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. Así, los sitios de glucosilación ligados en N pueden añadirse a un anticuerpo alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de estas secuencias de tripéptidos. La glucosilación ligada en O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, el más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Los sitios de glucosilación ligados en O pueden añadirse a un anticuerpo insertando o sustituyendo uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original.

El término “marcado con epítipo” se refiere al anticuerpo fusionado con una marca de epítipo. El polipéptido de la marca de epítipo tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de forma que no interfiera con la actividad del anticuerpo. La marca de epítipo es preferentemente suficientemente única de manera que el anticuerpo contra el mismo no reaccione sustancialmente de forma cruzada con otros epítipos. Polipéptidos de marca adecuados generalmente tienen al menos 6 residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácidos (preferentemente entre aproximadamente 9-30 residuos). Ejemplos incluyen el polipéptido de marca HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)]; la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan y col., Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)]; y la marca de glucoproteína D del virus del herpes simple D (gD) y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)]. Otras marcas a modo de ejemplo son una secuencia de poli-histidina, generalmente de aproximadamente seis residuos de histidina, que permite el aislamiento de un compuesto así marcado usando quelación con níquel. Otras marcas y etiquetas, tales como la marca FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY), muy conocidas y rutinariamente usadas en la materia, están englobadas por la invención.

Como se usa en el presente documento, el término “epítipo de unión a receptor salvaje” se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Deleciones

Las deleciones de secuencias de aminoácidos incluyen deleciones del extremo amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de uno a cientos o más residuos, produciendo fragmentos que retienen la afinidad de unión por antígeno diana, además de deleciones intra-secuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples, por ejemplo, 2, 3 o más. Por ejemplo, los sitios de glucosilación pueden deleccionarse o moverse a una posición diferente deleccionando parte o todo el tripéptido u otras secuencias de reconocimiento para la glucosilación.

Sustituciones

Otro tipo de muteína es una muteína de sustitución de aminoácidos. Estas muteínas tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminada y un residuo diferente insertado en su lugar. Se contempla mutagénesis de sustitución dentro de cualquiera de las regiones hipervariables o CDR o regiones estructurales. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1. La sustitución más conservativa se encuentra bajo el encabezado de “sustituciones preferidas”. Si tales sustituciones no producen cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados “sustituciones a modo de ejemplo” en la

Tabla 1, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y seleccionarse los productos.

TABLA 1

	Original	Ejemplar	Sustituciones de residuos preferidas
5			
10	Ala (A)	val; leu; ile	val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
	Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	arg
	Asp (D)	glu; asn	glu
15	Cys (C)	ser; ala	ser
	Gln (Q)	asn; glu	asn
	Glu (E)	asp; gln	asp
	Gly (G)	ala	
20	His (H)	asn; gln; lys; arg	
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu
			norleucine
	Leu (L)	norleucine; ile; val; met;	ile
25		ala; phe	
	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
	Pro (P)	ala	
30	Ser (S)	thr	
	Thr (T)	ser	ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
35	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala;	leu
		norleucine	

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Residuos que se producen naturalmente se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones conservativas implican sustituir un aminoácido con otro miembro de su clase. Sustituciones no conservativas implican sustituir un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala.

La maduración por afinidad generalmente implica preparar y seleccionar variantes de anticuerpo que tienen sustituciones dentro de las CDR de un anticuerpo parental y seleccionar variantes que tienen propiedades biológicas mejoradas tales como afinidad de unión con respecto al anticuerpo parental. Una forma conveniente para generar tales variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se expresan de un modo monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas en fago se seleccionan entonces para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/01047, WO 93/112366, WO 95/15388 y WO 93/19172.

Los actuales procedimientos de maduración por afinidad de anticuerpo pertenecen a dos categorías de mutagénesis: estocástica y no estocástica. La PCR propensa a error, cepas bacterianas de mutadas (Low y col., J. Mol. Biol. 260, 359-68, 1996) y mutagénesis de saturación (Nishimiya y col., J. Biol. Chem. 275:12813-20, 2000; Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85, 2002) son ejemplos típicos de procedimientos de mutagénesis estocástica (Rajpal y col., Proc Natl. Acad Sci U S A. 102:8466-71, 2005). Las técnicas no estocásticas frecuentemente usan mutagénesis de barrido con alanina o dirigida a sitio para generar colecciones limitadas de variantes específicas. Algunos procedimientos se describen en más detalle a continuación.

Maduración por afinidad mediante procedimientos de inmunopurificación – La maduración por afinidad de anticuerpos recombinantes se realiza comúnmente mediante varias rondas de inmunopurificación de anticuerpos candidatos en presencia de cantidades decrecientes de antígeno. El decrecer la cantidad de antígeno por ronda selecciona los anticuerpos con la mayor afinidad por el antígeno, dando así anticuerpos de alta afinidad a partir de un gran conjunto de material de partida. La maduración por afinidad mediante inmunopurificación es muy conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Huls y col. (Cancer Immunol Immunother. 50:163-71, 2001). Los procedimientos de maduración por afinidad usando tecnologías de expresión en fago se describen en cualquier parte en el presente documento y se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Daugherty y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 97:2029-34, 2000).

Mutagénesis Look-through – La mutagénesis Look-through (LTM) (Rajpal y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71, 2005) proporciona un procedimiento para mapear rápidamente el sitio de unión a anticuerpo. Para LTM, nueve aminoácidos, representativos de las principales químicas de cadenas laterales proporcionadas por los 20 aminoácidos naturales, se seleccionan para diseccionar las contribuciones funcionales de las cadenas laterales a la unión en cada posición en las seis CDR de un anticuerpo. LTM genera una serie de posiciones de mutaciones únicas dentro de una CDR en la que cada residuo “natural” se sustituye sistemáticamente con uno de nueve aminoácidos seleccionados. Las CDR mutadas se combinan para generar bibliotecas combinatorias de fragmentos variables monocatenarios (scFv) de complejidad y tamaño crecimiento sin llegar a ser prohibitivas para la expresión cuantitativa de todas las variantes. Después de la selección positiva, los clones con unión mejorada se secuencian, y se mapean mutaciones beneficiosas.

PCR propensa a error – La PCR propensa a error implica la aleatorización de ácidos nucleicos entre diferentes rondas de selección. La aleatorización se produce a una baja tasa por la tasa de error intrínseco de la polimerasa usada, pero puede potenciarse por PCR propensa a error (Zaccolo y col., J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999) usando una polimerasa que tiene una alta tasa de error intrínseco durante la transcripción (Hawkins y col., J Mol Biol. 226:889-96, 1992). Después de los ciclos de mutación, los clones con afinidad mejorada por el antígeno se seleccionan usando procedimientos rutinarios en la materia.

Barajado de ADN – El barajado de ácido nucleico es un procedimiento para recombinación homóloga *in vitro* o *in vivo* de conjuntos de polinucleótidos más cortos o más pequeños para producir polinucleótidos de variante. El barajado de ADN se ha descrito en la patente de EE.UU. n° 6.605.449, la patente de EE.UU. 6.489.145, el documento WO 02/092780 y Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-51 (1994). Generalmente, el barajado de ADN comprende 3 etapas: fragmentación de los genes que van a barajarse con ADNsa I, hibridación al azar de fragmentos y reensamblaje o llenado en el gen fragmentado por PCR en presencia de ADN polimerasa (PCR sexual), y amplificación de producto reensamblado por PCR convencional.

El barajado de ADN se diferencia de la PCR propensa a error en que es una reacción en cadena inversa. En PCR propensa a error, el número de sitios de iniciación de polimerasa y el número de moléculas crece exponencialmente. A diferencia, en el reensamblaje o barajado de ácidos nucleicos de polinucleótidos al azar, el número de sitios de iniciación y el número (pero no el tamaño) de los polinucleótidos al azar disminuye con el tiempo.

En el caso de un anticuerpo, el barajado de ADN permite la libre asociación combinatoria de, por ejemplo, todas las CDR1 con todas las CDR2 con todas las CDR3. Se contempla que múltiples familias de secuencias puedan barajarse en la misma reacción. Además, el barajado generalmente conserva el orden relativo, de forma que, por ejemplo, CDR1 no se encontrará en la posición de CDR2. Barajados raros contendrán un gran número de las mejores CDR (por ejemplo, mayor afinidad) y estos barajados raros pueden seleccionarse basándose en su afinidad superior.

El polinucleótido molde que puede usarse en el barajado de ADN puede ser ADN o ARN. Puede ser de diversas longitudes dependiendo del tamaño del gen o polinucleótido más corto o más pequeño que vaya a reensamblarse. Preferentemente, el polinucleótido molde tiene de 50 pb a 50 kb. El polinucleótido molde debe ser frecuentemente bicatenario.

Se contempla que polinucleótidos de ácido nucleico monocatenario o bicatenario que tienen regiones de identidad con el polinucleótido molde y regiones de heterología con el polinucleótido molde puedan añadirse al polinucleótido molde, durante la etapa inicial de la selección de genes. También se contempla que dos moldes de polinucleótido diferentes, pero relacionados, puedan mezclarse durante la etapa inicial.

Barrido con alanina – La mutagénesis por barrido con alanina puede realizarse para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Cunningham y Wells (Science 244:1081-1085, 1989). Se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo más variantes u otras o variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita determinarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado se realiza barrido con ala o mutagénesis al azar en el codón o región diana y las muteínas de anticuerpo expresadas se seleccionan para la actividad deseada.

Diseño asistido por ordenador – Alternativamente, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y antígeno, o para usar software informático para modelar tales puntos de contacto. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en el presente documento y anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

La maduración por afinidad implica preparar y seleccionar muteínas de anticuerpo que tienen sustituciones dentro de las CDR de un anticuerpo parental y seleccionar muteínas que tienen propiedades biológicas mejoradas tales como afinidad de unión con respecto al anticuerpo parental. Una forma conveniente para generar tales muteínas de sustitución es la maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las muteínas de anticuerpo así generadas se expresan de un modo monovalente a partir de partículas de fago filamentoso como fusiones con el producto del gen III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Las muteínas expresadas en fago se seleccionan entonces para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión).

La mutagénesis por barrido con alanina puede realizarse para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan tales muteínas, el panel de muteínas se somete a selección como se describe en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para el posterior desarrollo.

Función efectora alterada

Se contemplan otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de manera que se potencie la eficacia del anticuerpo, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado pueden tener capacidad de internalización mejorada y/o elevada destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véanse Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad potenciada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente puede manipularse un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y así puede tener lisis del complemento potenciada y capacidades de ADCC. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989). Además, se ha mostrado que secuencias dentro de la CDR pueden hacer que un anticuerpo se una a un MHC clase II y provoque una respuesta de linfocitos T auxiliares no deseada. Una sustitución conservativa puede permitir que el anticuerpo retenga la actividad de unión, aunque pierda su capacidad para provocar una respuesta de linfocitos T no deseada. Véase también Steplewski y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4852-6, que describe anticuerpos quiméricos en los que una región variable murina se unió a regiones constantes gamma 1, gamma 2, gamma 3 y gamma 4 humanas.

En ciertas realizaciones de la invención puede desearse usar un fragmento de anticuerpo, en vez de un anticuerpo intacto, para aumentar, por ejemplo, la penetración tumoral. En este caso, puede desearse modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de aumentar su semivida en suero, por ejemplo, añadiendo moléculas tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, que incluyen polímeros de polisacáridos, a fragmentos de anticuerpos para aumentar la semivida. Esto también pueden lograrse, por ejemplo, por incorporación de un epítipo de unión a receptor salvaje en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una marca de péptido que luego se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, por ejemplo, por ADN o síntesis de péptidos) (véase, por ejemplo, el documento WO96/32478).

El epítoto de unión a receptor salvaje constituye preferentemente una región en la que uno cualquiera o más residuos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferentemente, tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc se transfieren. Todavía más preferido, el epítoto se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o VH, o más de una región tal, del anticuerpo. Alternativamente, el epítoto se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región C_L o región V_L, o ambas, del fragmento de anticuerpo. Véanse también las solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478 que describen variantes de Fc y su interacción con el receptor salvaje.

Así, los anticuerpos de la invención pueden comprender una porción Fc humana, una porción Fc consenso humana o una muteína de la misma que retiene la capacidad para interactuar con el receptor salvaje de Fc, que incluye muteínas en las que las cisteínas que participan en el enlace disulfuro se modifican o eliminan, y/o en las que una met se añade al extremo N y/o se eliminan uno o más de los 20 aminoácidos del extremo N, y/o se eliminan regiones que interactúan con el complemento, tales como el sitio de unión a C1q, y/o se elimina el sitio de ADCC [véase, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992)]. Los anticuerpos de la clase IgG también pueden incluir una región constante diferente, por ejemplo, puede modificarse un anticuerpo IgG2 para mostrar una región constante de IgG1 o IgG4.

En el caso de IgG1, las modificaciones a la región constante, particularmente la región bisagra o CH2, pueden aumentar o disminuir la función efectora, que incluye actividad de ADCC y/o de CDC. En otras realizaciones, una región constante de IgG2 se modifica para reducir la formación de agregados de anticuerpo-antígeno. En el caso de IgG4, las modificaciones a la región constante, particularmente la región bisagra, pueden reducir la formación de semianticuerpos. En realizaciones específicas a modo de ejemplo se proporciona mutar la secuencia bisagra de IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys a la secuencia bisagra de IgG1 Cys-Pro-Pro-Cys.

Estudios previos mapearon el sitio de unión sobre IgG humanas y murinas para FcR principalmente a la región bisagra inferior compuesta de los residuos de IgG 233-239. Otros estudios propusieron segmentos anchos adicionales, por ejemplo, Gly316-Lys338 para receptor I de Fc humana, Lys274-Arg301 y Tyr407-Arg416 para receptor III de Fc humano, o se encontraron algunos residuos específicos fuera de la bisagra inferior, por ejemplo, Asn297 y Glu318 para IgG2b murina que interactúa con receptor II de Fc murino. El informe de la estructura cristalina de 3,2 Å del fragmento Fc de IgG1 humana con receptor IIIA de Fc humano delineó los residuos de IgG1 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 y Ala327-Ile332 como implicados en la unión a receptor IIIA de Fc. Se ha sugerido basándose en la estructura cristalina que además de la bisagra inferior (Leu234-Gly237), los residuos en los bucles del dominio CH2 de IgG FG (residuos 326-330) y BC (residuos 265-271) podrían desempeñar una función en la unión a receptor IIA de Fc. Véase Shields y col., J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001). La mutación de residuos dentro de sitios de unión a receptor de Fc puede producir función efectora alterada, tal como actividad de ADCC o CDC alterada, o semivida alterada. Como se ha descrito anteriormente, posibles mutaciones incluyen inserción, delección o sustitución de uno o más residuos, que incluyen sustitución con alanina, una sustitución conservativa, una sustitución no conservativa, o sustitución con un residuo correspondiente de aminoácido en la misma posición de una subclase de IgG diferente (por ejemplo, sustitución de un residuo de IgG1 con un residuo de IgG2 correspondiente en esa posición).

Shields y col. informaron que los residuos de IgG1 que participan en la unión a todos los receptores de Fc humanos están localizados en el dominio CH2 proximal a la bisagra y se clasifican en dos categorías del siguiente modo: 1) posiciones que pueden interactuar directamente con todos los FcR incluyen Leu234-Pro238, Ala327 y Pro329 (y posiblemente Asp265); 2) posiciones que influyen en la naturaleza o posición de los hidratos de carbono incluyen Asp265 y Asn297. Los residuos de IgG1 adicionales que afectaron la unión al receptor II de Fc son del siguiente modo: (mayor efecto) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298 y (menor efecto) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 y Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A y D270A redujeron la unión. Además, de los residuos identificados anteriormente para todos los FcR, residuos de IgG1 adicionales que redujeron la unión al receptor IIIA de Fc el 40 % o más son del siguiente modo: Ser239, Ser267 (Gly sola), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338 y Asp376. Muteínas que mejoraron la unión a FcRIIIA incluyen T256A, K290A, S298A, E333A, K334A y A339T. Lys414 mostró una reducción del 40 % en la unión a FcRIIA y FcRIIB, Arg416 una reducción del 30 % a FcRIIA y FcRIIIA, Gln419 una reducción del 30 % a FcRIIA y una reducción del 40 % a FcRIIB, y Lys360 una mejora del 23 % a FcRIIIA. Véase también Presta y col., Biochem. Soc. Trans. (2001) 30, 487-490.

Por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 6.194.551 describe muteínas con función efectora alterada que contienen mutaciones en la región de IgG humana Fc, en la posición de aminoácidos 329, 331 ó 322 (usando numeración de Kabat), algunas de las cuales muestran unión a C1q o actividad de CDC reducida. Como otro ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 6.737.056 describe muteínas con unión a efector o a receptor de Fc-gamma alterada que contienen mutaciones en la región de IgG humana Fc, en la posición de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439 (usando numeración de Kabat), algunas de las cuales muestran perfiles de unión a receptor asociados a actividad de ADCC o CDC reducida.

De estas, se establece que una mutación en la posición de aminoácido 238, 265, 269, 270, 327 ó 329 reduce la unión a FcRI, se establece que una mutación en la posición de aminoácido 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ó 439 reduce la unión a FcRII y se establece que una mutación en la posición de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 ó 437 reduce la unión a FcRIII.

La patente de Estados Unidos nº 5.624.821 informa que la actividad de unión a Clq de un anticuerpo murino puede alterarse mutando el residuo de aminoácido 318, 320 ó 322 de la cadena pesada y que el residuo de sustitución 297 (Asn) produce la eliminación de actividad lítica.

La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos nº 20040132101 describe muteínas con mutaciones en las posiciones de aminoácidos 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 ó 332 (usando numeración de Kabat) o posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 ó 332 (usando numeración de Kabat), de las cuales las mutaciones en las posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 ó 332 pueden reducir la actividad de ADCC o reducir la unión a un receptor gamma de Fc.

Chappel y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(20):9036-40 informan que la actividad citotóxica de IgG1 es una propiedad intrínseca de su dominio CH2 de la cadena pesada. Mutaciones puntuales individuales en cualquiera de los residuos de aminoácidos 234-237 de IgG1 redujeron o abolieron significativamente su actividad. Se requirió la sustitución de todos los residuos de IgG1 234-237 (LLGG) en IgG2 e IgG4 para restaurar la actividad de unión completa. Se observó que un anticuerpo IgG2 que contenía la secuencia entera de ELLGGP (residuos 233-238) era más activo que la IgG1 natural.

Isaacs y col., J Immunol. 1998;161(8):3862-9 informan que las mutaciones dentro de un motivo crítico para la unión de Fc gammaR (glutamato 233 a prolina, leucina/fenilalanina 234 a valina y leucina 235 a alanina) previno completamente la disminución de células diana. La mutación glutamato 318 a alanina eliminó la función efectora de IgG2b de ratón y también redujo la potencia de IgG4 humana.

Armour y col., Mol Immunol. 2003;40(9):585-93 identificaron muteínas de IgG1 que reaccionaban con el receptor activante, FcgammaRIIIa, al menos 10 veces menos eficazmente que la IgG1 natural, pero cuya unión al receptor inhibitor, FcgammaRIIb, era solo cuatro veces reducida. Se hicieron mutaciones en la región de aminoácidos 233-236 y/o en las posiciones de aminoácidos 327, 330 y 331. Véase también el documento WO 99/58572.

Xu y col., J Biol Chem. 1994;269(5):3469-74 informan que mutar Pro331 de IgG1 a Ser disminuyó significativamente la unión a C1q y casi eliminó la actividad lítica. A diferencia, la sustitución de Pro por Ser331 en IgG4 confirió actividad lítica parcial (40 %) a la muteína de Pro331 de IgG4.

Schuurman y col., Mol Immunol. 2001;38(1):1-8 informan que la mutación de una de las cisteínas de bisagra implicadas en la formación de enlaces entre cadenas pesadas, Cys226, a serina produjo un enlace entre cadenas pesadas más estable. La mutación de la secuencia bisagra de IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys a la secuencia bisagra de IgG1 Cys-Pro-Pro-Cys también estabiliza significativamente la interacción covalente entre las cadenas pesadas.

Angal y col., Mol Immunol. 1993;30(1):105-8 informan que la mutación de la serina en la posición de aminoácido 241 en IgG4 a prolina (encontrada en esa posición en IgG1 y IgG2) condujo a la producción de un anticuerpo homogéneo, además de prolongar la semivida en suero y mejorar la distribución en tejido en comparación con la IgG4 química original.

La invención también contempla la producción de moléculas de anticuerpo con estructura de hidratos de carbono alterada que produce actividad efectora alterada, que incluye moléculas de anticuerpo con fucosilación ausente o reducida que presentan actividad de ADCC mejorada. Se conocen una variedad de formas en la técnica para realizar esto. Por ejemplo, la actividad efectora de ADCC se media uniendo la molécula de anticuerpo al receptor FcγRIII, que se ha mostrado que depende de la estructura de hidratos de carbono de la glucosilación ligada en N en Asn-297 del dominio CH2. Anticuerpos no fucosilados se unen a este receptor con afinidad elevada y provocan funciones efectoras mediadas por FcγRIII más eficazmente que anticuerpos fucosilados nativos. Por ejemplo, la producción recombinante de anticuerpo no fucosilado en células CHO en las que la enzima alfa-1,6-fucosil transferasa se ha inactivado produce anticuerpo con actividad de ADCC 100 veces elevada [Yamane-Ohnuki y col., Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22]. Pueden llevarse a cabo efectos similares para disminuir la actividad de esta u otras enzimas en la ruta de fucosilación, por ejemplo, un tratamiento con ARNip o ARN antisentido, manipulando líneas celulares para inactivar la(s) enzima(s) o cultivando con inhibidores selectivos de la glucosilación [Rothman y col., Mol Immunol. 1989 Dec;26(12):1113-23]. Algunas cepas de células huésped, por ejemplo, línea celular Lec13 o YB2/O de hibridoma de rata producen naturalmente anticuerpos con menores niveles de fucosilación. Shields y col., J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):26733-40; Shinkawa y col., J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):3466-73. También se ha determinado que un aumento en el nivel de hidrato de carbono bifurcado, por ejemplo, un anticuerpo que se produce recombinantemente en células que expresan en exceso la enzima GnTIII, aumenta la

actividad de ADCC. Umana y col., Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80. Se ha predicho que la ausencia de solo uno de los dos residuos de fucosa puede ser suficiente para aumentar la actividad de ADCC. Ferrara y col., J Biol Chem. 2005 Dec 5 [publicación electrónica previa a la impreza].

5 **Otras modificaciones covalentes**

Dentro del alcance de la presente invención también están incluidas modificaciones covalentes del anticuerpo. Pueden prepararse por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos elegidos como diana del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos del extremo N o C.

Los residuos de cisteinilo reaccionan muy comúnmente con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo también se derivatizan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido .alfa.-bromo- β -(5-imidozolil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridildisulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo se derivatizan mediante reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferentemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos de lisinilo y del extremo amino se hacen reaccionar con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar los residuos que contiene alfa.-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pK_a del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, además del grupo épsilon-amino de arginina.

La modificación específica de residuos de tirosilo puede hacerse, con interés particular en introducir marcas espectrales en residuos de tirosilo, mediante reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más comúnmente, N-acetilimidizol y tetranitrometano se usan para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo se yodan usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas (R-N.dbd.C.dbd.N-R') en las que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente a los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Estos residuos se desamidán bajo condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos .alfa.-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)), acetilación de la amina del extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar químicamente o enzimáticamente glucósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula huésped que tiene capacidades de glucosilación para glucosilación ligada en N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el (los) azúcar(es) puede(n) unirse a (a) arginina y histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquellos de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO87/05330 publicado el 11 de septiembre 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306 (1981).

La eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente sobre el anticuerpo puede llevarse a cabo químicamente o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que queda

el anticuerpo intacto. La desglucosilación química se describe por Hakimuddin y col. Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) y por Edge y col., Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono sobre anticuerpos puede lograrse por el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura y col., Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende ligar el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioles polioxielados, sorbitol polioxielado, glucosa polioxielada, glicerol polioxielado, polioxiálquenos, o polímeros de polisacárido tales como dextrano. Tales procedimientos se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo las patentes de EE.UU. nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192, 4.179.337, 4.766.106, 4.179.337, 4.495.285, 4.609.546 o EP 315 456.

Cada molécula de anticuerpo puede unirse a una o más moléculas de polímero (es decir, 1, 2, 3, 4, 5 o más). Las moléculas de polímero se unen preferentemente a anticuerpos por moléculas ligadoras. El polímero puede ser, en general, un polímero sintético o que se produce naturalmente, por ejemplo, un polímero de polialqueno, polialqueno o polioxiálqueno opcionalmente sustituido de cadena lineal o ramificada o un polisacárido ramificado o sin ramificar, por ejemplo, homo- o heteropolisacárido. Polímeros preferidos son polioxielilpolioles y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ en la que R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alanol. Preferentemente, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos, más preferentemente es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, preferentemente entre 1 y 1.000, más preferentemente entre 2 y 500. El PEG tiene un peso molecular promedio preferido entre 1000 y 40.000, más preferentemente entre 2000 y 20.000, lo más preferentemente entre 3.000 y 12.000. Preferentemente, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferentemente es un grupo hidroxilo terminal. Es este grupo hidroxilo el que se activa preferentemente para reaccionar con un grupo amino libre sobre el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que pueden variarse el tipo y la cantidad de grupos reactivos para lograr un PEG/anticuerpo covalentemente conjugado de la presente invención. Polímeros preferidos, y procedimientos para unirlos a péptidos se muestran en la patente de EE.UU. nº 4.766.106; 4.179.337; 4.495. 285; y 4.609.546.

Terapia génica

La administración de un anticuerpo terapéutico a células apropiadas puede efectuarse mediante terapia génica *ex vivo*, *in situ* o *in vivo* usando cualquier enfoque adecuado conocido en la técnica, que incluye usar procedimientos físicos de transferencia de ADN (por ejemplo, liposomas o tratamientos químicos) o usar vectores virales (por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados, o un retrovirus). Por ejemplo, para terapia *in vivo*, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado, tanto solo como conjuntamente con un vector, liposoma o precipitado, puede inyectarse directamente en el sujeto, y en algunas realizaciones, puede inyectarse en el sitio en el que se desea la expresión del compuesto de anticuerpo. Para tratamiento *ex vivo*, las células del sujeto se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células y las células modificadas se devuelven al sujeto bien directamente o bien, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.892.538 y 5.283.187. Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere o no en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped previsto. Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano y precipitación con fosfato de calcio. Un vector comúnmente usado para la administración *ex vivo* de un ácido nucleico es un retrovirus.

Otras técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* incluyen transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus de herpes simple I o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos. El ácido nucleico y el agente de transfección se asocian opcionalmente a una micropartícula. Agentes de transfección a modo de ejemplo incluyen co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, el anfífilo de amonio cuaternario DOTMA (bromuro de (dioleoiloxipropil)-trimetilamonio, comercializado como Lipofectin por GIBCO-BRL) (Felgner y col., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 6077-6081); diésteres de glutamato lipófilos con cabezas laterales de trimetilamonio (Ito y col. (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); los lípidos parentales metabolizables tales como el lípido catiónico dioctadecilamido glicilpermina (DOGS, Transfectam, Promega) y dipalmitoilfosfatidil etanolamilespermina (DPPES) (J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986); sales de amonio cuaternario metabolizables (DOTB, metilsulfato de N-(1-[2,3-dioleoiloxi]propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) (Boehringer, Mannheim), polietilenimina (PEI), ésteres de dioleilo, ChoTB, ChoSC, DOSC) (Leventis y col. (1990) Biochim. Inter. 22, 235-241); 3beta[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Chol), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE)/3beta[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol-DC-Chol en mezclas uno a uno (Gao y col., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14), espermina, espermidina, lipopoliaminas (Behr y col., Bioconjugate Chem, 1994, 5: 382-389), polilisinas lipófilas (LPLL) (Zhou y col., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), hidróxido de [(1,1,3,3-tetrametilbutil)resoxi]etoxi]etil]dimetilbencilamonio (hidróxido de DEBDA) con exceso de fosfatidilcolina/colesterol (Ballas y col., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), mezclas de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)/DOPE (Pinnaduwa y col., (1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37), diéster lipófilo de ácido glutámico (TMAG) con DOPE, CTAB, DEBDA, bromuro de didodecilamonio (DDAB) y estearilamina en mezcla

con fosfatidiletanolamina (Rose y col., (1991) *Biotechnology* 10, 520-525), DDAB/DOPE (TransfectACE, BRL), y lípidos que llevan oligogalactosa. Agentes potenciadores de la transfección a modo de ejemplo que aumentan la eficiencia de transferencia incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno, péptido disruptor de lisosomas (Ohmori N I y col., *Biochem Biophys Res Commun* Jun. 27, 1997;235(3):726-9), proteoglicanos basados en condroitano, proteoglicanos sulfatados, polietilenimina, polilisina (Pollard H y col. *J Biol Chem*, 1998 273 (13):7507-11), péptido de unión a integrina CYGGRGDTP, nonasacárido de dextrano lineal, glicerol, grupos colesterilo unidos en el enlace internucleosídico del extremo 3' de un oligonucleótido (Letsinger, R. L. 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86: (17):6553-6), lisofosfatida, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina y 1-oleoil-lisofosfatidilcolina.

En algunas situaciones puede desearse administrar el ácido nucleico con un agente que dirige el vector que contiene ácido nucleico a células diana. Tales moléculas "que eligen diana" incluyen anticuerpos específicos para una proteína de la membrana superficial de la célula sobre la célula diana, o un ligando para un receptor sobre la célula diana. Si se emplean liposomas pueden usarse las proteínas que se unen a una proteína de la membrana superficial de la célula asociada a endocitosis para elegir diana y/o para facilitar la captación. Ejemplos de tales proteínas incluyen proteínas de la cápside y fragmentos de las mismas trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo y proteínas que eligen como diana la localización intracelular y potencian la semivida intracelular. En otras realizaciones puede usarse endocitosis mediada por receptor. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en Wu y col., 1987 o Wagner y col., 1990. Para una revisión de los protocolos de marcado de genes y de terapia génica actualmente conocidos véase Anderson 1992. Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en su interior. Para revisiones adicionales de tecnología de terapia génica véase Friedmann, *Science*, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, *Nature*, suplemento al vol. 392, nº 6679, pág. 25-30 (1998); Verma, *Scientific American*: 68-84 (1990); y Miller, *Nature*, 357: 455460 (1992).

Procedimientos de selección

Otro aspecto de la presente invención se refiere a procedimientos de identificación de anticuerpos que modulan (es decir, disminuyen) la actividad de un PRLR que comprenden poner en contacto un PRLR con un anticuerpo y determinar si el anticuerpo modifica o no la actividad del PRLR. La actividad en presencia del anticuerpo de prueba se compara con la actividad en ausencia del anticuerpo de prueba. Si la actividad de la muestra que contiene el anticuerpo de prueba es inferior a la actividad en la muestra que carece del anticuerpo de prueba, el anticuerpo habrá inhibido la actividad. Agentes terapéuticos eficaces dependen de identificar agentes eficaces que carecen de toxicidad significativa. Los anticuerpos pueden seleccionarse para afinidad de unión mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de desplazamiento del gel, transferencias Western, ensayo de competición radiomarcada, co-fraccionamiento por cromatografía, co-precipitación, reticulación, ELISA, resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, Biacore®), fluorometría resuelta en el tiempo (por ejemplo, DELFIA) y similares, que se describen en, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (1999), *Current Protocols in Immunology* (2007) John Wiley & Sons, NY. Además, la resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, Biacore®) puede emplearse para evaluar la competición entre dos anticuerpos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 7 más adelante). La fluorometría resuelta en el tiempo (por ejemplo, DELFIA) también puede emplearse para evaluar el nivel de competición entre dos anticuerpos. Por ejemplo, un ensayo DELFIA® de selección competitivo basado en microplaca (Perkin Elmer) puede realizarse según protocolos proporcionados por el fabricante.

Para seleccionar inicialmente anticuerpos que se unen al epítipo deseado sobre el antígeno diana puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). También pueden usarse ensayos competitivos de unión rutinarios en los que el anticuerpo desconocido se caracteriza por su capacidad para inhibir la unión de diana a un anticuerpo específico para diana de la invención. Puede usarse antígeno intacto, fragmentos del mismo tales como el dominio extracelular, o epítopes lineales. El mapeo de epítopes se describe en Champe y col., *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394 (1995).

En una variación de un ensayo de unión *in vitro*, la invención proporciona un procedimiento que comprende las etapas de (a) poner en contacto un PRLR inmovilizado con un anticuerpo candidato y (b) detectar la unión del anticuerpo candidato al PRLR. En una realización alternativa, el anticuerpo candidato se inmoviliza y la unión de PRLR se detecta. La inmovilización se lleva a cabo usando cualquiera de los procedimientos muy conocidos en la técnica, que incluyen enlace covalente a un soporte, una perla o una resina cromatográfica, además de interacción de alta afinidad no covalente tal como unión a anticuerpo, o uso de unión a estreptavidina/biotina en la que el compuesto inmovilizado incluye un resto de biotina. La detección de la unión puede llevarse a cabo (i) usando una marca radiactiva sobre el compuesto que no está inmovilizado, (ii) usando una marca fluorescente sobre el compuesto no inmovilizado, (iii) usando un anticuerpo inmuno específico para el compuesto no inmovilizado, (iv) usando una marca sobre el compuesto no inmovilizado que excite un soporte fluorescente con el que está unido el compuesto inmovilizado, además de otras técnicas muy conocidas y rutinariamente practicadas en la materia.

Los anticuerpos que modulan (es decir, aumentan, disminuyen o bloquean) la actividad del antígeno diana pueden identificarse incubando un anticuerpo candidato con antígeno diana (o una célula que expresa antígeno diana) y determinando el efecto del anticuerpo candidato sobre la actividad o expresión del antígeno diana. La actividad en

presencia del anticuerpo de prueba se compara con la actividad en ausencia del anticuerpo de prueba. Si la actividad de la muestra que contiene el anticuerpo de prueba es inferior a la actividad en la muestra que carece del anticuerpo de prueba, el anticuerpo tendrá actividad inhibida. La selectividad de un anticuerpo que modula la actividad de un polipéptido o polinucleótido de antígeno diana puede evaluarse comparando sus efectos sobre el antígeno diana con su efecto sobre otros compuestos relacionados.

En realizaciones particulares a modo de ejemplo se contempla que los anticuerpos sean probados para su efecto en un sistema de células cultivadas para determinar su capacidad para prevenir la dimerización de PRLR y/o neutralizar PRLR en la inducción de la fosforilación de STAT5 y/o MAPK y/o AKT u otros indicadores de señalización de PRLR. Adicionalmente pueden usarse ensayos celulares que incluyen ensayos de proliferación, ensayos en agar blando y/o ensayos de citotoxicidad como se describen en el presente documento para evaluar un anticuerpo para PRLR particular.

La actividad biológica de un anticuerpo particular, o combinación de anticuerpos, puede evaluarse *in vivo* usando un modelo animal adecuado. Por ejemplo, pueden usarse modelos de cáncer xenogénicos en los que células cancerosas humanas se introducen en animales inmunodeprimidos tales como ratones desnudos o SCID. La eficacia puede predecirse usando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, regresión de tumores o metástasis, y similares.

La invención también comprende ensayos de selección de alto rendimiento (HTS) para identificar anticuerpos que interaccionan con o inhiben la actividad biológica (es decir, inhiben la actividad enzimática, actividad de unión, señalización intracelular, etc.) de antígeno diana. Los ensayos de HTS permiten la selección de grandes números de compuestos de una manera eficiente. Se contemplan sistemas de HTS basados en células para investigar la interacción entre el antígeno diana y sus componentes de unión. Los ensayos de HTS se diseñan para identificar "líderes" o "compuestos cabeza de serie" que tienen la propiedad deseada, a partir de los cuales pueden diseñarse modificaciones para mejorar la propiedad deseada.

En otra realización de la invención se emplea selección de alto rendimiento para fragmentos de anticuerpos o CDR con 1, 2, 3 o más modificaciones a aminoácidos dentro de las CDR que tienen afinidad de unión adecuada por un polipéptido de antígeno diana.

Terapia de combinación

Habiendo identificado más de un anticuerpo que es eficaz en un modelo animal, puede ser adicionalmente ventajoso mezclar juntos dos o más de tales anticuerpos (que se unen a los mismos antígenos diana o diferentes) para proporcionar eficacia todavía mejorada. Las composiciones que comprenden uno o más anticuerpos pueden administrarse a personas o mamíferos que padecen, o predispuestas a sufrir, una enfermedad o trastorno relacionado con EphB3. La administración concurrente de dos agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, en tanto que haya un solapamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes estén ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla administración simultánea o secuencial, ya que es administración en diferentes días o semanas.

Aunque la terapia con anticuerpos puede ser útil para todas las fases de los cánceres, la terapia con anticuerpos puede ser particularmente apropiada en cánceres avanzados o metastásicos. El combinar el procedimiento de terapia con anticuerpos con una pauta quimioterapéutica o de radiación puede preferirse en pacientes que no han recibido tratamiento quimioterapéutico, mientras que el tratamiento con la terapia con anticuerpos puede indicarse para pacientes que han recibido una o más quimioterapias. Adicionalmente, la terapia con anticuerpos también puede permitir el uso de dosificaciones reducidas de quimioterapia concomitante, particularmente en pacientes que no toleran muy bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

Los procedimientos de la invención contemplan la administración de anticuerpos individuales, además de combinaciones, o "mezclas", de diferentes anticuerpos. Tales mezclas de anticuerpos pueden tener ciertas ventajas en tanto que contengan anticuerpos que explotan diferentes mecanismos efectores o combinan directamente anticuerpos citotóxicos con anticuerpos que se basan en funcionalidad efectora inmune. Tales anticuerpos en combinación pueden presentar efectos terapéuticos sinérgicos. A modo de ejemplo, los procedimientos de la invención contemplan administrar anticuerpos para M-CSF, RANKL, Taxotere™, Herceptin™, Avastin™, Erbitux™ o anticuerpos anti-EGFR y tamoxifeno.

Un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce destrucción de células. El término está previsto que incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o toxinas sintéticas, o fragmentos de las mismas. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe o previene la función de células y/o no produce destrucción de células. Un agente no citotóxico puede incluir un agente que puede activarse para ser citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir una perla, liposoma, matriz o partícula (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. 2003/0028071 y 2003/0032995). Tales agentes pueden conjugarse, acoplarse, ligarse o asociarse a un anticuerpo según la invención.

Los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen, sin limitación, agentes alquilantes tales como carboplatino y cisplatino; agentes alquilantes de mostazas de nitrógeno; agentes alquilantes de nitrosourea tales como carmustina (BCNU); antimetabolitos tales como metotrexato; ácido folínico; antimetabolitos de análogos de purina, mercaptopurina; antimetabolitos de análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5-FU) y gemcitabina (Gemzar®); antineoplásicos hormonales tales como goserelina, leuprolida y tamoxifeno; antineoplásicos naturales tales como aldesleucina, interleucina-2, docetaxel, etopósido (VP-16), interferón alfa, paclitaxel (Taxol®) y tretinoína (ATRA); antineoplásicos naturales de antibióticos tales como bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, daunomicina y mitomicinas que incluyen mitomicina C; y antineoplásicos naturales de alcaloides de la vinca tales como vinblastina, vincristina, vindesina; hidroxiaurea; aceglatona, adriamicina, ifosfamida, enocitabina, epitiostanol, aclarubicina, ancitabina, nimustina, clorhidrato de procarbazona, carbocina, carboplatino, carmofur, cromomicina A3, polisacáridos antitumorales, factores plaquetarios antitumorales, ciclofosfamida (Cytosin®), esquizoflan, citarabina (citosina arabinósido), dacarbazina, tiolosina, tiotepa, tegafur, dolastatinas, análogos de dolastatina tales como auristatina, CPT-11 (irinotecan), mitoxantrona, vinorelbina, tenipósido, aminopterina, carminomicina, esperamicinas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.675.187), neocarzinostatina, OK-432, bleomicina, furtulon, broxuridina, busulfano, honvan, peplomicina, bestatina (Ubenimex®), interferón- β , mepitiostano, mitobronitol, melfalan, péptidos de laminina, lentinan, extracto de *Coriolus versicolor*, tegafur/uracilo, estramustina (estrógeno/mecloretamina).

Además, agentes adicionales usados como terapia para pacientes con cáncer incluyen EPO, G-CSF, ganciclovir; antibióticos, meperidina; zidovudina (AZT); interleucinas 1 a 18, que incluyen mutantes y análogos; interferones o citocinas, tales como interferones α , β y γ ; hormonas, tales como hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y análogos y, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); factores de crecimiento tales como factores de crecimiento transformantes β (TGF- β), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor liberador de hormona de crecimiento (GHRF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor homólogo a factor de crecimiento de fibroblastos (FGFHF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento de insulina (IGF); factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y β); factor inhibidor de la invasión 2 (IIF-2); proteínas morfogenéticas óseas 1-7 (BMP 1-7); somatostatina; timosina α -1; γ -globulina; superóxido dismutasa (SOD); antagonistas de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) tales como, por ejemplo, Cetuximab y Gefitinib; antagonistas y moduladores del PR (receptor de progesterona) tales como mifepristona y Onapristone™; inhibidores de aromatasas tales como, por ejemplo, anastrozol, exemestano y letrozol; agentes antiestrogénicos, antagonistas y moduladores de receptores de estrógenos tales como, por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno y fulvestrant; factores del complemento; factores antiangiogénicos; materiales antigénicos; y profármacos.

Profármaco se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica o no citotóxica para células tumorales en comparación con el fármaco parental y puede activarse enzimáticamente o convertirse en una forma parental activa o la más activa. Véanse, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella y col., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt y col., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β -lactama, opcionalmente profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida u opcionalmente profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para su uso en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Administración y preparación

Los anticuerpos de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el procedimiento de administración deseado. Vehículos adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con anticuerpos, retiene la actividad deseada del anticuerpo y no es reactivo con los sistemas inmunitarios del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, distintos vehículos farmacéuticos convencionales tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares. Puede usarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 % y similares, y pueden incluir otras proteínas para estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc., sometidas a modificaciones químicas suaves o similares.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de

octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

El anticuerpo se administra por cualquier medio adecuado que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas. Se contemplan otros procedimientos de administración, que incluyen administración tópica, particularmente transdérmica, transmucosa, rectal, oral o local, por ejemplo, mediante un catéter colocado próximo al sitio deseado.

Para administración nasal, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden ser un espray o aerosol que contiene un disolvente(s) apropiado(s) y opcionalmente otros compuestos tales como, pero no se limitan a, estabilizadores, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Un propulsor para una formulación de aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono, o un hidrocarburo basado en un disolvente de bajo punto de ebullición.

Las formas de dosificación inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones en aceite que pueden prepararse usando un agente dispersante o humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de disolución o en forma de una suspensión, que se prepara con un disolvente o diluyente. Disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, disolución de Ringer, o una solución salina acuosa isotónica.

Para inyección, la formulación farmacéutica y/o medicamento puede ser un polvo adecuado para reconstitución con una disolución apropiada como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de éstos incluyen, pero no se limitan a, polvos liofilizados, secados giratoriamente o secados por pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Si los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de exposición a humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro,

puede lograrse la estabilización modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas. Pueden usarse otras estrategias conocidas en la técnica.

- 5 Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para ser de acción corta, de liberación rápida, de acción prolongada o de liberación sostenida como se describe en el presente documento. Así, las formulaciones farmacéuticas también pueden formularse para liberación controlada o para liberación lenta.

10 Las presentes composiciones también pueden comprender, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento y/o efecto de administración prolongado. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden comprimirse en pellas o cilindros e implantarse intramuscularmente o subcutáneamente como inyecciones de liberación prolongada o como implantes tales como prótesis endovasculares. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

15 Además de aquellas formas de dosificación representativas descritas anteriormente, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente conocidos para aquellos expertos en la materia y así se incluyen en la presente invención. Tales excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

20 Pueden ajustarse dosificaciones específicas dependiendo de las condiciones de enfermedad, la edad, peso corporal, condiciones de salud general, genotipo, sexo y dieta del sujeto, intervalos de dosis, vías de administración, tasa de eliminación y combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que contienen cantidades eficaces están perfectamente dentro de los límites de la experimentación rutinaria y, por tanto, bien dentro del alcance de la presente invención.

25 Los anticuerpos de la invención se prepararán frecuentemente sustancialmente libres de otras inmunoglobulinas que se producen naturalmente u otras moléculas biológicas. Anticuerpos preferidos también presentarán toxicidad mínima cuando se administran a un mamífero aquejado de, o predispuesto a sufrir cáncer.

30 Las composiciones de la invención pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Las disoluciones resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio y estabilizadores (por ejemplo, 1 20 % de maltosa, etc.).

40 Los anticuerpos de la presente invención también pueden administrarse mediante liposomas, que son pequeñas vesículas compuestas de diversos tipos de lípidos y/o fosfolípidos y/o tensioactivo que son útiles para la administración de un fármaco (tales como los anticuerpos desvelados en el presente documento y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico). Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, dispersiones de fosfolípidos, capas laminares y similares, y pueden servir de vehículos para dirigir los anticuerpos a un tejido particular, además de para aumentar la semivida de la composición. Están disponibles una variedad de procedimientos para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.837.028 y 5.019.369.

45 Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describen en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); y las patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la patente de EE.UU. nº 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contenido dentro del liposoma [véase, por ejemplo, Gabizon y col., J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989)].

60 La concentración de anticuerpo en estas composiciones puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 10 %, normalmente al menos aproximadamente el 25 % a hasta el 75 % o el 90 % en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., según el modo de administración particular seleccionado. Procedimientos actuales para preparar composiciones administrables por vía oral, tópicamente y parenteralmente serán conocidos o evidentes para aquellos expertos en la materia y se describen en detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 19ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995).

65 La determinación de una cantidad eficaz de una composición de la invención para tratar enfermedad en un paciente

puede llevarse a cabo mediante procedimientos empíricos convencionales que son muy conocidos en la técnica.

Las composiciones de la invención se administran a un mamífero que ya padece, o tiene predisposición a o está en riesgo de, por ejemplo, cáncer de mama, próstata o de pulmón, en una cantidad suficiente para prevenir o al menos detener parcialmente el desarrollo de la enfermedad. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”. Cantidades eficaces de un anticuerpo variarán y dependerán de la gravedad de la enfermedad y el peso y estado general del paciente que está tratándose, pero generalmente oscilan de aproximadamente 1,0 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Dosis a modo de ejemplo pueden oscilar de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg por administración. El anticuerpo también puede dosificarse por área superficial corporal (por ejemplo, hasta 4,5 g/metro cuadrado). Otras dosis a modo de ejemplo de anticuerpo incluyen hasta 8 g totales en una única administración (suponiendo un peso corporal de 80 kg o área superficial corporal de 1,8 metros cuadrados).

La administración puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse por una o más administraciones en bolo separadas, o por infusión a corto o a largo plazo durante un periodo de, por ejemplo, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 minutos o más. Tras un periodo de tratamiento inicial, y dependiendo de la respuesta del paciente y la tolerancia de la terapia, pueden administrarse dosis de mantenimiento, por ejemplo, semanalmente, bisemanalmente, cada 3 semanas, cada 4 semanas, mensualmente, bimensualmente, cada 3 meses, o cada 6 meses, según se necesite para mantener la respuesta del paciente. Pueden necesitarse dosificaciones más frecuentes hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad, y pueden ajustarse dosificaciones según sea necesario. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. La terapia puede ser durante un periodo definido o puede ser crónica y continuar durante un periodo de años hasta la progresión de la enfermedad o muerte.

Pueden llevarse a cabo administraciones únicas o múltiples de las composiciones con los niveles de dosis y patrón que se seleccionan por el médico práctico. Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra o no para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

En cualquier caso, las formulaciones deben proporcionar una cantidad de anticuerpo terapéutico con el tiempo que sea suficiente para ejercer la actividad biológica deseada, por ejemplo, prevenir o minimizar la gravedad del cáncer. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse solas o como una terapia auxiliar conjuntamente con otros terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento de tales enfermedades.

La composición de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará en un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos para los médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que va a administrarse estará gobernada por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar la enfermedad, afección o trastorno mediado por diana. Tal cantidad es preferentemente inferior a la cantidad que es tóxica para el huésped o hace que el huésped sea significativamente más susceptible a infecciones.

El anticuerpo no necesita formularse, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de enfermedad, afección o trastorno o tratamiento, y otros factores tratados anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se usan anteriormente en este documento o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

En otra realización de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de la afección deseada. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo de la invención. La etiqueta sobre o asociada al recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que contiene un segundo agente terapéutico (incluyendo cualquiera de los segundos agentes terapéuticos para enfermedades tratadas en el presente documento o conocidas en la técnica). El artículo de fabricación puede comprender además otro recipiente que contiene un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer o disolución de dextrosa para reconstituir una formulación de anticuerpo liofilizada. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de

vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones para su uso.

Inmunoterapia

Anticuerpos útiles en el tratamiento de pacientes que tienen cánceres incluyen aquellos que son capaces de iniciar una potente respuesta inmunitaria contra el tumor y aquellos que son capaces de dirigir la citotoxicidad. Los anticuerpos conjugados con agentes citotóxicos pueden usarse para elegir como diana los agentes citotóxicos para tejidos tumorales que expresan PRLR. Alternativamente, los anticuerpos pueden provocar lisis de células tumorales por o bien mecanismos de citotoxicidad celular mediada por complemento o bien dependientes de anticuerpos (ADCC), ambos de los cuales requieren una porción Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para interacción con sitios de receptor de Fc de células efectoras o proteínas del complemento. Además, anticuerpos que ejercen un efecto biológico directo sobre el crecimiento tumoral son útiles en la práctica de la invención. Posibles mecanismos por los que tales anticuerpos directamente citotóxicos pueden actuar incluyen inhibición del crecimiento celular, modulación de la diferenciación celular, modulación de los perfiles de factores de angiogénesis tumoral y la inducción de apoptosis. El mecanismo por el que un anticuerpo particular ejerce un efecto antitumoral puede evaluarse usando cualquier número de ensayos *in vitro* diseñados para determinar ADCC, ADMMC, lisis celular mediada por el complemento, etc., como se conoce generalmente en la técnica.

En una realización, la inmunoterapia se lleva a cabo usando anticuerpos que se unen a PRLR e inhiben la activación de PRLR.

Los anticuerpos anti-PRLR pueden administrarse en su forma “desnuda” o sin conjugar, o pueden conjugarse directamente con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico, o pueden conjugarse indirectamente con polímeros de vehículo que comprenden tales otros agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Los anticuerpos pueden marcarse detectablemente mediante el uso de radioisótopos, marcas de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), marcas enzimáticas (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) marcas fluorescentes o luminiscentes o bioluminiscentes (tales como FITC o rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, y similares. Los procedimientos para llevar a cabo tal marcado son muy conocidos en la técnica; por ejemplo, véase (Sternberger, L.A. y col., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. y col., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. y col., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

La conjugación de restos de anticuerpos se describe en la patente de EE.UU. nº 6.306.393. También se describen técnicas generales en Shih y col., Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih y col., Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); y Shih y col., patente de EE.UU. nº 5.057.313. Este procedimiento general implica hacer reaccionar un componente de anticuerpo que tiene una porción de hidrato de carbono oxidada con un polímero portador que tiene al menos una función amina libre y que se carga con una pluralidad de fármaco, toxina, quelante, aditivos de boro u otro agente terapéutico. Esta reacción produce un enlace de base de Schiff inicial (imina) que puede estabilizarse mediante reducción a una amina secundaria para formar el conjugado final.

El polímero portador puede ser, por ejemplo, un aminodextrano o polipéptido de al menos 50 residuos de aminoácidos. En la técnica se conocen diversas técnicas para conjugar un fármaco u otro agente con el polímero portador. Puede usarse un portador de polipéptido en lugar de aminodextrano, pero el portador de polipéptido debe tener al menos 50 residuos de aminoácido en la cadena, preferentemente 100-5000 residuos de aminoácido. Al menos algunos de los aminoácidos deben ser residuos de lisina o residuos de glutamato o aspartato. Las aminas colgantes de residuos de lisina y carboxilatos colgantes de glutamina y aspartato son convenientes para unir un fármaco, toxina, inmunomodulador, quelante, aditivo de boro u otro agente terapéutico. Ejemplos de soportes de polipéptido adecuados incluyen polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, co-polímeros de los mismos, y polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para conferir propiedades de solubilidad deseable sobre el soporte cargado resultante y conjugado.

Alternativamente pueden prepararse anticuerpos conjugados conjugando directamente un componente de anticuerpo con un agente terapéutico. El procedimiento general es análogo al procedimiento indirecto de conjugación, excepto que un agente terapéutico se une directamente a un componente de anticuerpo oxidado. Por ejemplo, un resto de hidrato de carbono de un anticuerpo puede unirse a polietilenglicol para prolongar la semivida.

Alternativamente, un agente terapéutico puede unirse en la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido mediante formación de enlaces disulfuro, o usando un reticulador heterobifuncional tal como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP). Yu y col., Int. J. Cancer 56:244 (1994). Técnicas generales para tal conjugación son muy conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Reticulation (CRC Press 1991); Upešlacis y col., “Modification of Antibodies by Chemical Methods” en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch y col. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, “Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies” en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter y col. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995). En la técnica se conocen una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de

N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluileno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno).

Finalmente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden uno o más restos de anticuerpos anti-EphB3 y otro polipéptido. Los procedimientos de preparación de proteínas de fusión de anticuerpos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.306.393. Proteínas de fusión de anticuerpos que comprenden un resto de interleucina-2 se describen por Boleti y col., Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet y col., Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank y col., Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), y Hu y col., Cancer Res. 56:4998 (1996).

En una realización, los anticuerpos de la invención se usan como radiosensibilizador. En tales realizaciones, los anticuerpos están conjugados con un agente radiosensibilizante. El término "radiosensibilizador", como se usa en el presente documento, se define como una molécula, preferentemente una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente eficaces para aumentar la sensibilidad de las células a ser radiosensibilizadas a radiación electromagnética y/o para promover el tratamiento de enfermedades que son tratables con radiación electromagnética. Enfermedades que son tratables con radiación electromagnética incluyen enfermedades neoplásicas, tumores benignos y malignos, y células cancerosas.

Los términos "radiación electromagnética" y "radiación" como se usan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, radiación que tiene la longitud de onda de 10^{-20} a 100 metros. Realización preferidas de la presente invención emplean la radiación electromagnética de: radiación gamma (10^{-20} a 10^{-13} m), radiación de rayos X (10^{-12} a 10^{-9} m), luz ultravioleta (10 nm a 400 nm), luz visible (400 nm a 700 nm), radiación infrarroja (700 nm a 1,0 mm) y radiación microondas (1 mm a 30 cm).

Los radiosensibilizadores son conocidos por aumentar la sensibilidad de células cancerosas a los efectos tóxicos de la radiación electromagnética. Muchos protocolos de tratamiento del cáncer actualmente emplean radiosensibilizadores activados por la radiación electromagnética de rayos X. Ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxiciditina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxiaurea, cisplatino, y análogos terapéuticamente eficaces y derivados de los mismos.

La terapia fotodinámica (PDT) de cánceres emplea luz visible como activador de la radiación del agente sensibilizante. Ejemplos de radiosensibilizantes fotodinámicos incluyen los siguientes, pero no se limitan a: derivados de hematoporfirina, Photofrin(R), derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño (SnET2), feoborbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc, y análogos terapéuticamente eficaces y derivados de los mismos.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un receptor (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa de dianas para tumores en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de aclaramiento y luego administración de un ligando (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido).

"Marca" se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directamente o indirectamente con el anticuerpo. La propia marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que sea detectable. Alternativamente, la marca puede no ser detectable por sí misma, pero puede ser un elemento que está unido por otro agente que es detectable (por ejemplo, una marca de epítopo o una de un par de componentes de unión tal como biotina-avidina, etc.). Así, el anticuerpo puede comprender una marca o etiqueta que facilita su aislamiento, y procedimientos de la invención para identificar anticuerpos incluyen una etapa de aislar el anticuerpo mediante interacción con la marca o etiqueta.

Inmunoconjugados terapéuticos a modo de ejemplo comprenden el anticuerpo descrito en el presente documento conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Las proteínas de fusión se describen en más detalle más adelante.

Quelantes para radiometales o potenciadores de la resonancia magnética son muy conocidos en la técnica. Típicos son los derivados de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) y ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA). Estos quelantes normalmente tienen grupos sobre la cadena lateral, por lo que el quelante puede unirse a un soporte. Tales grupos incluyen, por ejemplo, bencilisotiocianato, por lo que el DTPA o EDTA puede acoplarse al grupo amina de un soporte. Alternativamente, los grupos carboxilo o grupos amina sobre un quelante pueden acoplarse a un soporte por activación o antes de la derivatización y luego acoplarse, todo por medios muy conocidos.

Los aditivos de boro, tales como carboranos, puede unirse a componentes de anticuerpo mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, pueden prepararse carboranos con funciones carboxilo sobre cadenas laterales colgantes, como es muy conocido en la técnica. La unión de tales carboranos a un soporte, por ejemplo, aminodextrano, puede lograrse por activación de los grupos carboxilo de los carboranos y condensación con aminos sobre el soporte para producir un conjugado intermedio. Tales conjugados intermedios se unen entonces a componentes de anticuerpo para producir inmunoconjugados terapéuticamente útiles, como se describe más adelante.

Puede usarse un soporte de polipéptido en lugar de aminodextrano, pero el soporte de polipéptido debe tener al menos 50 residuos de aminoácidos en la cadena, preferentemente 100-5000 residuos de aminoácidos. Al menos algunos de los aminoácidos deben ser residuos de lisina o residuos de glutamato o aspartato. Las aminos colgantes de residuos de lisina y los carboxilatos colgantes de glutamina y aspartato son convenientes para unir un fármaco, toxina, inmunomodulador, quelante, aditivo de boro u otro agente terapéutico. Ejemplos de soportes de polipéptidos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglútamico, ácido poliaspártico, co-polímeros de los mismos, y polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para conferir propiedades de solubilidad deseables sobre el soporte cargado resultante e inmunoconjugado.

La conjugación del conjugado intermedio con el componente de anticuerpo se efectúa oxidando la porción de hidrato de carbono del componente de anticuerpo y haciendo reaccionar los carbonilos del aldehído (y cetona) resultantes con grupos amina que quedan sobre el soporte después de cargarlo con un fármaco, toxina, quelante, inmunomodulador, aditivo de boro u otro agente terapéutico. Alternativamente, un conjugado intermedio puede unirse a un componente de anticuerpo oxidado mediante grupos amina que han sido introducidos en el conjugado intermedio después de cargar con el agente terapéutico. La oxidación se efectúa convenientemente tanto químicamente, por ejemplo, con NaIO_4 u otro reactivo glicolítico, como enzimáticamente, por ejemplo, con neuraminidasa y galactosa oxidasa. En el caso de un soporte de aminodextrano, no todas las aminos del aminodextrano se usan normalmente para cargar un agente terapéutico. Las aminos restantes del aminodextrano condensan con el componente de anticuerpo oxidado para formar aductos de bases de Schiff, que luego se estabilizan reductoramente, normalmente con un agente reductor de borohidruro.

Se usan procedimientos análogos para producir otros inmunoconjugados según la invención. Los soportes de polipéptidos cargados tienen preferentemente residuos de lisina libres que quedan para la condensación con la porción de hidrato de carbono oxidada de un componente de anticuerpo. Los carboxilos sobre el soporte de polipéptido pueden convertirse, si fuera necesario, en aminos por, por ejemplo, activación con DCC y reacción con un exceso de una diamina.

El inmunoconjugado final se purifica usando técnicas convencionales, tales como cromatografía de tamizado sobre Sephacryl S-300 o cromatografía de afinidad usando uno o más epítopes de CD84Hy.

Alternativamente, los inmunoconjugados pueden prepararse conjugando directamente un componente de anticuerpo con un agente terapéutico. El procedimiento general es análogo al procedimiento indirecto de conjugación, excepto que un agente terapéutico se une directamente a un componente de anticuerpo oxidado.

Se apreciará que otros agentes terapéuticos pueden sustituirse por los quelantes descritos en el presente documento. Aquellos expertos en la materia podrán idear esquemas de conjugación sin excesiva experimentación.

Como otra ilustración, un agente terapéutico puede unirse en la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido mediante formación de enlaces disulfuro. Por ejemplo, pueden construirse péptidos de toxoide tetánico con un único residuo de cisteína que se usa para unir el péptido a un componente de anticuerpo. Como alternativa, tales péptidos pueden unirse al componente de anticuerpo usando un reticulante heterobifuncional, tal como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP). Yu y col., *Int. J. Cancer*, 56:244 (1994). Técnicas generales para tal conjugación son muy conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Reticulation* (CRC Press 1991); Upešlacis y col., "Modification of Antibodies by Chemical Methods" en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch y col. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies" en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter y col. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995).

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluil-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para conjugación de radionúclido con el anticuerpo (véase,

por ejemplo, el documento WO94/11026).

Como se ha descrito anteriormente, pueden usarse restos de hidrato de carbono en la región Fc de un anticuerpo para conjugar un agente terapéutico. Sin embargo, la región Fc puede estar ausente si un fragmento de anticuerpo se usa como componente de anticuerpo del inmunoconjugado. Sin embargo, es posible introducir un resto de hidrato de carbono en la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Leung y col., J. Immunol. 154:5919 (1995); Hansen y col., patente de EE.UU. nº 5.443.953. El resto de hidrato de carbono manipulado se usa entonces para unir un agente terapéutico.

Además, aquellos expertos en la materia reconocerán numerosas variaciones posibles de los procedimientos de conjugación. Por ejemplo, el resto de hidrato de carbono puede usarse para unir polietilenglicol con el fin de prolongar la semivida de un anticuerpo intacto, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en sangre, linfa u otros fluidos extracelulares. Además, es posible construir un "inmunoconjugado divalente" uniendo agentes terapéuticos a un resto de hidrato de carbono y a un grupo sulfhidrilo libre. Un grupo sulfhidrilo libre tal puede localizarse en la región bisagra del componente de anticuerpo.

Proteínas de fusión de anticuerpos

La presente invención contempla el uso de proteínas de fusión que comprenden uno o más restos de anticuerpo y otro polipéptido, tal como un inmunomodulador o resto de toxina. Los procedimientos de preparación de proteínas de fusión de anticuerpos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.306.393. Las proteínas de fusión de anticuerpos que comprenden un resto de interleucina-2 se describen por Boleti y col., Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet y col., Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank y col., Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996) y Hu y col., Cancer Res. 56:4998 (1996). Además, Yang y col., Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995), describen una proteína de fusión que incluye un fragmento F(ab')₂ y un resto de factor de necrosis tumoral alfa.

Los procedimientos de preparación de proteínas de fusión de anticuerpo-toxina en los que una molécula recombinante comprende uno o más componentes de anticuerpo y una toxina o agente quimioterapéutico también son conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, se han descrito proteínas de fusión de anticuerpo-exotoxina A de *Pseudomonas* por Chaudhary y col., Nature 339:394 (1989), Brinkmann y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman y col., J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels y col., Int. J. Can. 60:137 (1995), Fominaya y col., J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan y col., Biochemistry 35:2872 (1996) y Schmidt y col., Int. J. Can. 65:538 (1996). Se han descrito proteínas de fusión de anticuerpo-toxina que contienen un resto de toxina diftérica por Kreitman y col., Leukemia 7:553 (1993), Nicholls y col., J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson y col., J. Biol. Chem. 270:28037 (1995) y Vallera y col., Blood 88:2342 (1996). Deonarain y col., Tumor Targeting 1:177 (1995), han descrito una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que tiene un resto de RNasa, mientras que Linardou y col., Cell Biophys. 24-25:243 (1994), produjeron una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que comprendía un componente de DNasa I. La gelonina se usó como resto de toxina en la proteína de fusión de anticuerpo-toxina de Wang y col., Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., 2-6 de abril de 1995, Parte 1, BIOT005. Como otro ejemplo, Dohlsten y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994), informaron de una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que comprendía enterotoxina-A estafilocócica.

Toxinas ilustrativas que se emplean adecuadamente en la preparación de tales conjugados son ricina, abrina, ribonucleasa, DNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*. Véase, por ejemplo, Pastan y col., Cell 47:641 (1986), y Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Otras toxinas adecuadas son conocidas para aquellos expertos en la materia.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anticancerígeno activo. Véanse, por ejemplo, el documento WO88/07378 y la patente de EE.UU. nº 4.975.278.

El componente de enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que se convierta en su forma citotóxica más activa.

Enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticancerígeno, 5-fluorouracilo; proteasas tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir

fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como abzimas, para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados de anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe en el presente documento para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente a los anticuerpos por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales tratados anteriormente. Alternativamente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature 312: 604-608 (1984)).

Usos no terapéuticos

Los anticuerpos de la invención pueden usarse como agentes de purificación por afinidad para antígeno diana o en ensayos de diagnóstico para antígeno diana, por ejemplo, detectando su expresión en células específicas, tejidos o suero. Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, para estos fines el anticuerpo se marca con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de manera que el tumor pueda localizarse usando inmunoescintigrafía.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos tales como ELISA, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987). Los anticuerpos también pueden usarse para inmunohistoquímica, para marcar muestras tumorales usando procedimientos conocidos en la técnica.

Por razones de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención puede proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Si el anticuerpo se marca con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que tras la disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos, que no pretenden ser de ningún modo limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de fragmentos de dominios DEC, S1 y S2 de PRLR

La expresión recombinante y purificación de fragmentos de PRLR correspondientes al dominio extracelular (DEC, aminoácidos 25-234 de SEC ID N°: 2), el dominio S1 (aminoácidos 25-125 de SEC ID N°: 2) y el dominio S2 (aminoácidos 126-234 de SEC ID N°: 2) de PRLR se llevó a cabo del siguiente modo. Construcciones de expresión para la expresión en insecto de DEC, S1 y S2 se diseñaron como se muestra en la Tabla 2, y se diseñaron cebadores para clonar los fragmentos basándose en sus respectivas secuencias de aminoácidos (como se muestra en la Tabla 3).

TABLA 2

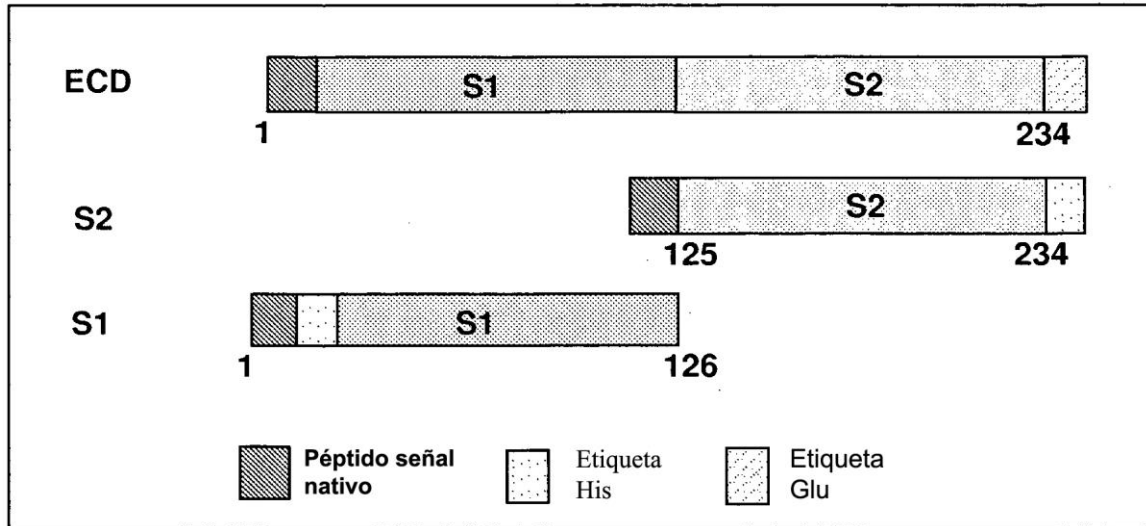


Tabla 3

Dominio	Cebadores PCR usados (F=Directo; R=Inverso)		Secuencias de cebador PCR
ECD	F1	SEQ ID NO: 3	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGA TATACATATGAAGGAAAATGTGGCATCTGCAA
	R1	SEQ ID NO: 4	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCCGTG ATGGTGATGGTGATGTGCTCCATCATTGATGGTGAAGTC
	F2	SEQ ID NO: 5	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGA ACCATG
S1	F3	SEQ ID NO: 6	CAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGGAAAATGTGGCAT CTGCAACC
	F4	SEQ ID NO: 7	GAAGGAAAATGTGGCATCTGCAACCGTTTTCTACTCTGCTACTT TTTCTC
	F5	SEQ ID NO: 8	CGTTTTCTACTCTGCTACTTTTTCTCAACACCTGCCTTCTGAATG GAGGAG
	F6	SEQ ID NO: 9	CAACACCTGCCTTCTGAATGGAGGAGCACATCACCATCACCAT CACGGAG
	F7	SEQ ID NO: 10	CACATCACCATCACCATCACGGAGCTCAGTTACCTCCTGGA ACCTGAG
	R2	SEQ ID NO: 11	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCCTGAATATGTAAGTC ACGTCCAC
	F8	SEQ ID NO: 12	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGA ACCATG
S2	F9	SEQ ID NO: 13	CAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGGAAAATGTGGCAT CTGCAACC
	F10	SEQ ID NO: 14	GAAGGAAAATGTGGCATCTGCAACCGTTTTCTACTCTGCTACTT TTTCTC

(continuada)

Dominio	Cebadores PCR usados (F=Directo; R=Inverso)		Secuencias de cebador PCR
	F11	SEQ ID NO: 15	CGTTTTCACTCTGCTACTTTTTCTCAACACCTGCCTTCTGAATG TTCA
	F12	SEQ ID NO: 16	TCTCAACACCTGCCTTCTGAATGTTAGCCAGACCCTCCTTGG AGCTG
	R3	SEQ ID NO: 17	CGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCATCATTATGGTGAAGTC ACTAGG
	R4	SEQ ID NO: 18	CAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGT GCTCC
	R5	SEQ ID NO: 19	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCC

Para clonar los dominios S1 y S2 se adoptó un enfoque de PCR anidada para incorporar marcas y para manipular la región 3'/5'. Para S1 hay 6 cebadores anidados directos y 1 cebador inverso para la clonación. Para S2 hay 5 cebadores anidados directos y 3 cebadores inversos para la clonación.

La amplificación por PCR se llevó a cabo usando PfuUltra™ Hotstart PCR Master Mix (Stratagene) según la recomendación del fabricante. El molde usado para la amplificación es el fragmento de DEC de PRLR clonado en pDEST3218 (datos no mostrados). El producto de PCR de DEC se clona en BlueBac4.5/V5-His TOPO-TA (Invitrogen) usando la estrategia de clonación de topoisomerasa. Los productos de PCR de S1 y S2 se clonan usando Gateway Technology (Invitrogen) en pAcMP3 adaptado internamente. Los clones seleccionados finales se confirmaron por secuenciación de la hebra doble. Se prepararon 10-20 µg de ADN para la transfección en insecto.

Las construcciones recombinantes se usaron para expresar los fragmentos de PRLR respectivos en células de insecto del siguiente modo. Se aisló baculovirus por purificación en placa de una cotransfección de ADN de plásmido que codifica el dominio extracelular de PRLR con ADN genómico de *Autographa californica* Sapphire™. El virus recombinante se amplificó y se usó para infectar células de insecto Tn5 a densidades que oscilaban de 1×10^6 a $1,5 \times 10^6$ células por ml, intervalo de MOI de 2-10 en un Wave Bioreactor de 10 l (volumen de trabajo). Tras 48 horas de infección, las células y el sobrenadante se recogieron, se centrifugaron y el sobrenadante se preparó para la concentración. El sobrenadante se clarificó sobre un cartucho de fibra hueca de 0,45 µm antes de 5x concentración con membrana de corte de MW de 10 kDa de flujo tangencial. Antes de la purificación de proteínas, el sobrenadante se esterilizó por filtración con matraces a vacío de 0,2 µm de poro de 1 l.

Se usaron procedimientos similares para expresar los dominios S1 y S2 en células de insecto, excepto que el fragmento de S1 no se concentró antes de la purificación y el fragmento de S2 se concentró sobre una cartucho de 5 kDa de MW.

Los fragmentos de PRLR se purificaron del siguiente modo. Sobrenadantes de cultivo de células de insecto que contenían DEC o subdominios de PRLR expresados se recibieron del grupo de expresión puro o se concentraron hasta 10x usando un aparato de casete de membranas apiladas (Pall Filtron) con un corte de peso molecular nominal de 1 ó 5 kD. Cuando fue práctico, los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Los sobrenadantes se cargaron directamente sobre columnas equilibradas con PBS.

Proteínas marcadas con His se purificaron sobre columnas HisTrap de 1 ó 5 ml (GE Healthcare) a las velocidades de flujo recomendadas por el fabricante. La proteína marcada con Glu se purificó sobre una columna de anticuerpo monoclonal anti-glu inmovilizado preparada del siguiente modo: anticuerpo monoclonal anti-glu purificado en PBS, a concentraciones de 3-10 mg/ml, se conjugó con Affi-gel 10 (Bio-Rad), un gel de agarosa activado con n-hidroxisuccinimida, por instrucciones del fabricante. La agarosa anti-glu se empaquetó en una columna XK 16 (GE Healthcare) y se ejecutó a una velocidad de flujo lineal 15-30 cm/h.

La elución de proteína de las columnas HisTrap fue por una elución en gradiente de 20 volúmenes de columna de tampón A (PBS) a tampón B (PBS + imidazol 0,25 M (IX-0005, EM Merck) pH 7,4). La elución de proteína de la columna anti-glu fue por PBS que contenía 0,1 mg/ml del péptido EYMPTD, que compete con el epítipo de Glu-Glu. Las fracciones se examinan por SDS-PAGE y transferencia Western o espectrometría de masas y se reúnen apropiadamente.

DEC o subdominios de PRLR reunidos se purificaron adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño

usando una columna Superdex 75 26/60 (GE Healthcare) equilibrada en PBS y se ejecutó a 2,5 ml/min. No se cargaron más de 10 ml sobre estas columnas. Las fracciones se examinaron por SDS-PAGE y se reunieron apropiadamente.

5 Ejemplo 2

Aislamiento de anticuerpos específicos para diana de bibliotecas de expresión en fago de anticuerpos humanos

10 Para aislar un panel de anticuerpos capaz de neutralizar la actividad de PRLR humano se investigaron en paralelo tres bibliotecas de expresión en fago de anticuerpos humanos que expresan fragmentos scFv. La diana usada para la inmunopurificación de bibliotecas fue el dominio extracelular (DEC) soluble del receptor de prolactina (aminoácidos 25-234 del receptor de prolactina humana) preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. El receptor se biotiniló (biotina NHS-LC, Pierce) y la inmunopurificación soluble se realizó sobre el DEC biotinilado.

15 La selección de anticuerpo específico para diana de la expresión en fago se llevó a cabo según procedimientos descritos por Marks y col. (Methods Mol Biol. 248:161-76, 2004). Brevemente, la biblioteca de expresión en fago se incubó con 50 pmoles del DEC biotinilado a temperatura ambiente durante 1 h y el complejo formado se capturó luego usando 100 µl de suspensión de perlas de estreptavidina (estreptavidina Dynabeads® M-280, Invitrogen). Los fagos no específicos se eliminaron lavando las perlas con tampón de lavado (PBS + 5 % de leche). Los fagos unidos se eluyeron con 0,5 ml de trietilamina 100 nM (TEA) y se neutralizaron inmediatamente mediante la adición de un volumen igual de TRIS-Cl 1 M a pH 7,4. El conjunto de fagos eluidos se usó para infectar células de *E. coli* TG1 que crecían en fase logarítmica, y el fagémido se rescató como se ha descrito (Methods Mol Biol. 248:161-76, 2004). La selección se repitió durante un total de tres rondas. Las colonias individuales obtenidas de las células TG1 infectadas con el fago eluido de la tercera ronda de inmunopurificación se seleccionaron para actividad de unión en un ensayo de ELISA. Brevemente, colonias individuales obtenidas de la célula TG1 infectada con fago eluido se usaron para inocular medios en placas de 96 pocillos. Los microcultivos se cultivaron a una $DO_{600}=0,6$, momento en el que la expresión del fragmento de anticuerpo soluble se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM tras el cultivo durante la noche en una estufa de incubación con agitación a 30 °C. Las bacterias se centrifugaron y el extracto periplásmico se preparó y se usó para detectar la actividad de unión de anticuerpo a DEC inmovilizado sobre microplacas de 96 pocillos (placas Immunosorb de fondo plano de 96 pocillos, Nunc) siguiendo el protocolo de ELISA convencional proporcionado por el fabricante de las microplacas.

35 Las afinidades de los anticuerpos anti-receptor de prolactina (PRLR) para unirse al dominio extracelular (DEC) recombinante se estimaron usando Biacore® 2000 y se usaron para la clasificación por afinidad de los anticuerpos. Se usó una superficie de captura de proteínas A/G para las fusiones de scFv-Fc humanas y se usó una superficie de captura de anticuerpo de conejo anti-IgG-Fc de ratón (RAM-Fc) para los anticuerpos producidos por hibridomas. Tanto los chips de captura de proteína A/G como de RAM-Fc fueron chips sensor CM5 con niveles máximos de molécula de captura (tanto proteína A/G como RAM-Fc) inmovilizada sobre las cuatro celdas de flujo mediante químicas de acoplamiento de EDC-NHS-amina convencionales según el protocolo recomendado de Biacore® Inc. El tampón de electroforesis fue HBS-EP (Biacore®, Inc.), la temperatura se fijó a 25 °C y la velocidad de flujo fue inicialmente 10 µl/min. Los anticuerpos purificados se diluyeron en HBS-EP para aproximar las concentraciones entre 1-3 µg/ml, y se inyectaron sobre los chips de captura durante 1 a 2 minutos. La velocidad de flujo aumentó a 25 a 30 µl/min. El DEC de PRLR recombinante se diluyó a 1 µg/ml y se inyectó durante 5 a 6 minutos con una disociación de 10 minutos.

50 Los ajustes se realizaron usando el software BIAEvaluation y se usaron calcular las constantes de asociación y disociación cinéticas (k_{as} y k_{dis} , respectivamente). Se usó el modelo de Langmuir de interacción 1:1 con corrección del transporte de masas para realizar el ajuste simultáneo de k_a/k_d a cada muestra. Se ajustaron varias muestras al mismo tiempo con los parámetros $R_{máx}$, k_{as} y k_{dis} fijados a la sección de ajuste. Cuando se produjo desviación del nivel inicial se usó el modelo del nivel inicial de desviación con el valor de desviación fijado constante y se entró manualmente. Los valores de desviación variaron de -0,03 a +0,05 UR/segundo.

55 La unión de anticuerpos también se evaluó midiendo la unión a células que expresan receptor de prolactina usando análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) y tecnología de ensayo fluorométrico de microvolúmenes (FMAT) (Swartzman y col., Anal Biochem. 271:143-51, 1999). Se analizaron las secuencias de los clones que mostraron unión por tanto ensayos de FACS como de FMAT, y los clones que codificaron secuencias de proteínas únicas de CDR3 de la cadena pesada y CDR3 de la cadena ligera se reformatearon a scFv-Fc como se describe en el Ejemplo 3 a continuación. Estos scFv-Fc se probaron para la capacidad para inhibir la fosforilación de ERK1/2 inducida por PRLR y proliferación inducida por PRLR de una línea celular de BaF3/PRLR, como se describe en los Ejemplos 5 y 6 más adelante. Los anticuerpos seleccionados se caracterizaron adicionalmente para la unión a los DEC, S1 y S2, además de para la competición relativa entre pares de anticuerpos para unirse a DEC de PRLR, como se describe en el Ejemplo 7. Los datos para anticuerpos seleccionados se muestran a continuación en la Tabla 4.

65

Tabla 4

Anticuerpo	pERK1/2 inhibición IC50	Proliferación inhibición IC50 para BaF3/PRLR	Constante de Disociación de Afinidad o Equilibrio K_D (nM)	Especificidad del dominio	Bin del epítipo (anticuerpos en el mismo bin compiten para enlazar con PRLR)
XPA.06.158	0.01	0.06	0.7	S1	4.5
XPA.06.167	0.04	0.14	4	S1	3.8
XPA.06.178	0.09	0.23	20	S1	3.8
XPA.06.145	0.30	0.77	10	S1	4
XPA.06.217	0.35	1.18	7	S1	7
XHA.06.983	0.11	0.1	0.1	S?	6
XHA.06.189	0.2	0.15	<0.1	S1	3.8
XHA.06.275	0.5	1.31	0.4	S2	5
XHA.06.567	0.65	7.06	0.8	S2	6.5

Ejemplo 3

Reformateo de clones al formato de scFv-Fc

Para cada clon de scFv único identificado en el Ejemplo 2, el ADNc que codifica el fragmento scFv se amplifica por PCR a partir del vector de expresión en fago y se liga en un vector de expresión de mamífero, que es una modificación del vector de expresión patentado XOMA's (descrito en el documento WO 2004/033693, que codifica tanto los genes de la región constante kappa (κ), lambda (λ) como gamma-2 (γ_2)), permitiendo la expresión de cada anticuerpo en una proteína scFv-Fc, en la que la porción Fc de la proteína representa el dominio CH2 y CH3 de la molécula de IgG1. La construcción de proteínas de fusión de scFv-Fc es muy conocida en la técnica, por ejemplo, véase Fredericks y col., Protein Eng Des Sel. 2004 Jan;17(1):95-106, Powers y col., J Immunol Methods. 1 de mayo de 2001; 251(1-2):123-35, o Shu y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1993, 90, 7995-7998. La patente de EE.UU. 5.892.019 también describe la construcción del vector de la proteína de fusión de Fc y la expresión de proteínas de fusión de scFv-Fc.

La expresión de la proteína de fusión se realiza por transfección de células en suspensión 293E con Lipofectamine 2000 (Invitrogen), usando las instrucciones del fabricante. Después de cinco días, las células se eliminan por centrifugación y la fusión de scFv-Fc se purifica del sobrenadante usando proteína A-Sepharose (GE Healthcare) usando el protocolo sugerido por el fabricante.

Ejemplo 4

Identificación de anticuerpos específicos para diana secretados por hibridomas murinos

Se generaron anticuerpos de ratón contra el dominio extracelular (DEC) del receptor de prolactina humana (PRLR) del siguiente modo. Seis ratones Balb/C se inmunizaron mediante inyección subcutánea con dominio extracelular de PRLR recombinante (descrito anteriormente). Los ratones recibieron 10 inyecciones durante un periodo de 28 días. Cuatro días después de la inyección final, los ratones se sacrificaron y se recogieron los ganglios linfáticos drenantes. Después de suspender las células de los ganglios linfáticos se fusionaron con la línea de células de mieloma de ratón P3xAg8.653 por fusión en ElectroCell usando un manipulador Electro-Cell BTX ECM2001 (Harvard Apparatus).

Tras la fusión, las células se sembraron en aproximadamente 40 placas de 96 pocillos. Después de 12 días las placas se seleccionaron por ELISA contra el DEC recombinante y en un FMAT. El ensayo de FMAT usó una línea celular CHO establemente transfectada para expresar un alto nivel de receptor PRLR.

Se probaron hibridomas seleccionados para la capacidad para inhibir la fosforilación de ERK1/2 inducida por PRLR y la proliferación inducida por PRLR de un línea celular BaF3/PRLR, como se describe en los Ejemplos 5 y 6 más adelante. Se caracterizaron adicionalmente anticuerpos seleccionados para unirse a DEC recombinante, S1 y S2, además de para la competición relativa entre pares de anticuerpos para unirse a DEC de PRLR como se describe en

el Ejemplo 7. Los datos para anticuerpos seleccionados se muestran anteriormente en la Tabla 4.

Ejemplo 5

5 Determinación del efecto de anticuerpos sobre la fosforilación de ERK1/2

Tras una privación de suero de 5 horas, células T47D se sembraron en placas de microtitulación en medio de crecimiento completo durante 24 horas a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con anticuerpos diluidos en medio sin suero que contenía 0,1 % de BSA durante 30 minutos a 37 °C. La concentración de partida final de los anticuerpos fue 40 ug/ml. El medio se eliminó y se añadió prolactina diluida en medio sin suero que contenía 0,1 % de BSA a una concentración final de 30 ng/ml. Las células se incubaron con prolactina durante 30 minutos a 37 °C, seguido de dos lavados con PBS helado. Se añadió tampón de lisis convencional que contiene detergentes, quelantes y diversos inhibidores de proteasa y fosfatasa para generar los lisados celulares. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) se midieron usando ELISA convencional según las instrucciones de DUOSET® IC Phospho-ERK1/ERK2, R&D Systems, Inc. Los resultados de un ensayo representativo se muestran en las Figuras 2, 3 y 4 y los resultados del ensayo para anticuerpos seleccionados se muestran anteriormente en la Tabla 4.

La Figura 7A-7C muestra las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos que tuvieron más del 80 % de inhibición en el ensayo de pERK.

Ejemplo 6

25 Determinación del efecto de anticuerpos sobre la proliferación de líneas celulares sensibles a PRL

Se generaron células BaF3/PRLR electroporando la línea de pro-linfocitos B murina BaF3 con un vector de expresión que contenía el PRLR humano de longitud completa y un casete de resistencia a neomicina. Las células se seleccionaron durante 7 días en medio complementado con G418 (1 mg/ml) y rmlL-3 (10 ng/ml), seguido de un período de selección de 7 días en rhPRL (1 ug/ml) sin G418 o IL-3. Durante un período de 14 días, la concentración de PRL en el medio se redujo escalonadamente hasta que se alcanzó un nivel de mantenimiento de 50 ng/ml. En el día del experimento, 1×10^4 células se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Los anticuerpos (en el formato de fusión de scFv-Fc) se añadieron a los pocillos a una concentración de 10 ug/ml, con y sin 50 ng/ml de rhPRL. Las placas se incubaron durante 48 h y se analizaron usando el reactivo CellTiterGlo. Las muestras se ejecutaron por triplicado, se evaluó el agonismo por proliferación celular inducida por anticuerpos en ausencia de PRL, mientras que el antagonismo se determinó por proliferación celular en presencia de PRL. Los resultados de este ensayo de proliferación para anticuerpos seleccionados se muestran anteriormente en la Tabla 4.

Con el fin de analizar la proliferación inducida por PRL y la inhibición de la proliferación por anticuerpos anti-PRLR, células T47D o MCF7-NCI se fraccionaron a una densidad de 1×10^6 células por ml de medio de crecimiento regular (RPMI sin rojo fenol/10 % de SBF) en un matraz T75 (volumen total de 12 ml). 72 h después del fraccionamiento, las células se tripsinaron, se contaron y se sembraron a una densidad de 5K por pocillo (T47D) o 20K por pocillo (MCF7) de una placa de 96 pocillos de fondo plano (100 ul por pocillo). Se sembraron células MCF7 en RPMI sin suero y sin rojo fenol, se sembraron células T47D en tanto RPMI sin suero como RPMI que contenía 10 % de suero tratado con carbón vegetal. 24 h después de la siembra se añadieron PRL y anticuerpos anti-PRLR a los pocillos (50 ul, 3 X concentrado). Después de 72 h de incubación se añadió ^3H timidina (1 uci por pocillo) a la placa durante un mínimo de 6 h en una estufa de incubación a 37 °C. Las células se recogieron usando tripsina y un recolector de células de placas de 96 pocillos Tomtec. Entonces, los filtros se transfirieron a un luminómetro Trilux y se analizaron (recuentos de 1 min). Los resultados del estudio de proliferación en la Figura 5 muestran que scFv inhibe el aumento en la proliferación mediado por prolactina.

Ejemplo 7

Medición de la afinidad de unión y competición mediante BIACORE

Se repitió el análisis BIACORE como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2 para determinar la unión relativa de anticuerpos seleccionados a dominios DEC, S1 y S2 de PRLR como se ha descrito anteriormente, excepto que las proteínas de S1, S2 o DEC se inyectaron a 10 ug/ml durante 2 minutos a 15 ul/minuto. Los datos de este ensayo se recogieron como puntos informativos (unidades de resonancia (UR)) por el software de control Biacore®, y se normalizaron dividiendo la cantidad de antígeno unida entre la cantidad de anticuerpo capturada. Los datos se muestran en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5. Unión de S1, S2 y DEC normalizada por anticuerpos anti-PRLR

Muestra	Enlace del Fragmento PRLR (RU enlazado/RU Ab Capturado)		
	S1	S2	ECD
XPA.06.145	3.0%	-0.8%	4.8%
XPA.06.158	20.5%	0.1%	28.2%
XPA.06.167	23.7%	0.1%	35.0%
XPA.06.178	16.4%	0.0%	20.5%
XPA.06.217	19.4%	0.4%	25.8%
XHA.06.567	0.9%	16.7%	31.1%
XHA.06.983	-2.2%	-2.5%	27.4%
XHA.06.275	0.0%	13.4%	26.2%
XHA.06.189	16.9%	0.2%	31.6%

Las afinidades de los anticuerpos purificados se determinaron realizando una serie de inyecciones en Biacore® 2000. La afinidad y las constantes de velocidad generadas son relevantes para estos anticuerpos que se unen al dominio extracelular (DEC) recombinante del receptor de prolactina (PRLR) a 25 °C en un sistema de tampón HBS-EP. Se preparó un chip sensor CM5 con aproximadamente 5000-1000 UR de proteína A/G mediante químicas de acoplamiento de EDC-NHS-amina convencionales según el protocolo recomendado de Biacore® Inc. y se usó para capturar los anticuerpos. Los anticuerpos purificados se diluyeron a aproximadamente 1 ug/ml en tampón HBS-EP para la captura. Se determinó el tiempo de inyección requerido para dar entre 250 y 400 UR de captura de anticuerpo. La captura de los anticuerpos para el análisis cinético se realizó inyectando los anticuerpos a 10 ul/minuto durante 1,5 a 3 minutos, dependiendo de los resultados de la optimización del nivel de captura.

Para el análisis cinético, la velocidad de flujo se fijó a 40 ul/minuto. Se prepararon cinco concentraciones de DEC de PRLR en una dilución sucesiva 1:3 de tanto 148 nM (4 ug/ml) como 37 nM (1 ug/ml). Cada concentración más un control de tampón (concentración cero) se inyectaron por duplicado. Los conjuntos de datos se referenciaron por duplicado y se ajustaron globalmente usando un modelo de Langmuir de interacción de unión 1:1. Este mismo análisis también se realizó para la construcción reformateada de IgG de XPA.06.167 para tanto construcciones de IgG1 como de IgG2.

Las constantes cinéticas y las afinidades para la unión de anticuerpos seleccionados a DEC de PRLR se muestran en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6. Resultados del análisis de afinidad

ANTICUERPO	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	KD (M)
XPA.06.131	3.4E+04	7.3E-05	2.1E-09
XPA.06.158	1.1E+05	7.3E-05	7.0E-10
XPA.06.141	6.3E+04	5.3E-04	8.4E-09
XPA.06.147	5.5E+05	5.3E-03	9.8E-09
XPA.06.167 IgG1	2.3E+05	6.0E-04	2.6E-09
XPA.06.167 IgG2	2.1E+05	5.72E-04	2.7E-09

Se usaron procedimientos similares para determinar las constantes cinéticas y afinidades por anticuerpos adicionales (resumido en la Tabla 7, a continuación).

Tabla 7

	kon	koff	KD
XHA.06.642	9.2E+05	8.6E-04	934 pM
XHA.06.275	1.0E+06	3.4E-04	337 pM
XHA.06.983	7.3E+05	3.2E-04	43 pM
	kon	koff	KD
chXHA.06.642	6.5E+04	5.2E-04	801 pM
chXHA.06.275	1.1E+06	2.2E-04	196 pM
chXHA.06.983	2.4E+05	1.0E-05	42 pM

La competición o interferencia relativa entre pares de anticuerpos (por ejemplo, análisis de emparejamiento) para unirse a PRLR se determinó del siguiente modo en una estrategia de ensayo de competición en serie. En este enfoque, un anticuerpo se inmoviliza sobre un chip sensor, tanto directamente como mediante un agente de captura, y se deja que se una al DEC a medida que se inyecta sobre el anticuerpo inmovilizado. Cuando sea necesario, el agente capturado en exceso se bloquea inyectando una alta concentración de IgG irrelevante (por ejemplo, cuando se prueban dos anticuerpos murinos usando una superficie de captura de conejo-anti-IgG de ratón). El anticuerpo que va a probarse para competición se inyecta posteriormente, y se determina su capacidad para unirse al DEC capturado por el primer anticuerpo. Si los dos anticuerpos se unen a epítopes espacialmente separados sobre el DEC, entonces el segundo anticuerpo también debe poder unirse al complejo de DEC/primer anticuerpo. Si los dos anticuerpos interfieren o compiten, entonces el segundo anticuerpo tampoco podrá unirse, o en absoluto, al complejo de DEC/primer anticuerpo. Los resultados de este análisis de competición se muestran en la Tabla 4 anterior (si dos anticuerpos tienen el mismo número de agrupamientos de epítopes, competirán entre sí para unirse a DEC y presentarán el mismo patrón de competición contra anticuerpos de los otros agrupamientos). La invención contempla específicamente la identificación de otros anticuerpos que se unen al mismo epítipo de PRLR que cualquiera de los anticuerpos en las agrupaciones descritas en el presente documento o que compiten con tales anticuerpos para unirse a DEC de PRLR.

Ejemplo 8

Efecto sobre la fosforilación de PRLR, STAT5 y AKT inducida por PRL por transferencia Western

La capacidad de anticuerpos seleccionados para inhibir la fosforilación inducida por PRL de STAT5 y AKT se determinó del siguiente modo. Se sembraron células durante la noche en 6 placas de pocillos a una densidad de 3×10^5 células/ml en RPMI sin rojo fenol/10 % de SBF. Al día siguiente el medio se sustituyó con RPMI sin suero durante 30 min. En algunos experimentos, anticuerpos anti-PRLR o de control no específicos se incubaron con células durante este periodo de privación de suero. Entonces se añadieron 50 ng/ml de PRL a los pocillos durante 30 min, después de lo cual las células se aclararon una vez en PBS y se lisaron en un tampón que consistía en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1 % de NP-40, Na_3VO_4 1 mM, NaF 50 mM, 0,25 % de desoxicolato e inhibidores de proteasa. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrífuga refrigerada y los lisados se cuantificaron usando reactivos BCA. Se separaron 30 µg de lisado de células completas por 10 % de SDS-PAGE y se detectaron proteínas usando anticuerpos específicos de fosfo para STAT5A/B (Y694/Y699, Upstate) o PRLR (Y546/Y611, interno) y ECL. Se determinó carga de proteína igual por tinción con anticuerpos específicos para STAT5 total (BD) o PRLR (Zymed) o AKT (Cell Signalling). Los resultados de un ensayo representativo del efecto de un anticuerpo específico para PRLR sobre la fosforilación intracelular de PRLR se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 9

Humanización de anticuerpos murinos

Este ejemplo expone un procedimiento para la humanización de un anticuerpo anti-PRLR murino.

Diseño de genes para cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo para PRLR humanizado

Las secuencias de aminoácidos de VL y VH para los anticuerpos XHA.06.983, XHA.06.275 y XHA.06.642 murinos se exponen en la Figura 10. La secuencia de un anticuerpo humano identificado usando la National Biomedical Foundation Protein Identification Resource o base de datos similar se usa para proporcionar la región estructural del anticuerpo humanizado. Para seleccionar la secuencia de la cadena pesada humanizada, la secuencia de la cadena pesada murina se alinea con la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo humano. En cada posición, el aminoácido del anticuerpo humano se selecciona para la secuencia humanizada, a menos que esa posición se

clasifique en una cualquiera de las cuatro categorías definidas a continuación, en cuyo caso se selecciona el aminoácido murino:

- 5 (1) La posición cae dentro de una región determinante de la complementariedad (CDR), como se define por Kabat, J. Immunol., 125, 961-969 (1980);
 (2) El aminoácido del anticuerpo humano es raro para cadenas pesadas humanas en esa posición, mientras que el aminoácido murino es común para cadenas pesadas humanas en esa posición;
 (3) La posición es inmediatamente adyacente a una CDR en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada murina; o
 10 (4) El modelado tridimensional del anticuerpo murino sugiere que el aminoácido está físicamente próximo a la región de unión a antígeno.

Para seleccionar la secuencia de la cadena ligera humanizada, la secuencia de la cadena ligera murina se alinea con la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo humano. El aminoácido del anticuerpo humano se selecciona en cada posición para la secuencia humanizada, a menos que la posición se clasifique de nuevo en una de las categorías que se han descrito anteriormente y se repiten a continuación:

- 15 (1) CDR;
 (2) Aminoácido murino más típico que el anticuerpo humano;
 20 (3) Adyacente a CDR; o
 (4) Posible proximidad tridimensional a la región de unión.

La secuencia de nucleótidos real de los genes de la cadena pesada y ligera se selecciona del siguiente modo:

- 25 (1) Las secuencias de nucleótidos codifican las secuencias de aminoácidos elegidas como se ha descrito anteriormente;
 (2) 5' de estas secuencias codificantes, las secuencias de nucleótidos codifican una secuencia (señal) conductora. Estas secuencias conductoras se eligieron como típicas de anticuerpos;
 30 (3) 3' de las secuencias codificantes, las secuencias de nucleótidos son las secuencias que siguen el segmento J5 de la cadena ligera de ratón y el segmento J2 de la cadena pesada de ratón, que son parte de la secuencia murina. Estas secuencias están incluidas debido a que contienen señales de donantes de corte y empalme; y
 (4) En cada extremo de la secuencia está un sitio Xba I para permitir el corte en los sitios Xba I y la clonación en el sitio Xba I de un vector.

35 Construcción de genes de la cadena ligera y pesada humanizados

Para sintetizar la cadena pesada, cuatro oligonucleótidos se sintetizan usando un sintetizador de ADN 380B de Applied Biosystems. Dos de los oligonucleótidos son parte de cada hebra de la cadena pesada, y cada oligonucleótido solapa el siguiente aproximadamente 20 nucleótidos para permitir la hibridación. Juntos, los oligonucleótidos cubren la región variable de la cadena pesada humanizada entera con algunos nucleótidos adicionales en cada extremo para permitir cortar en los sitios Xba I. Los oligonucleótidos se purifican a partir de geles de poliacrilamida.

45 Cada oligonucleótido se fosforila usando cinasa del polinucleótido ATP y T4 mediante procedimientos convencionales (Maniatis y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Para hibridar los oligonucleótidos fosforilados se suspenden juntos en 40 µl de TA (Tris-acetato 33 mM, pH 7,9, acetato de potasio 66 mM, acetato de magnesio 10 mM) a una concentración de aproximadamente 3,75 µM cada uno, se calientan a 95 °C durante 4 min y se enfrían lentamente a 4 °C. Para sintetizar el gen completo a partir de los oligonucleótidos sintetizando la hebra opuesta de cada oligonucleótido se añaden los siguientes componentes en un volumen final de 100 µl:

55	10 µl	Oligonucleótidos hibridados
	0.16 mM	Cada desoxiribonucleotido
60	0.5 mM	ATP
	0.5 mM	DTT
	100 µg/ml	BSA
	3.5 µg/ml	Proteína T4 g43 (ADN polimerasa)
	25 µg/ml	Proteína T4 g44/62 (proteína accesorio de polimerasa)
	25 µg/ml	Proteína 45 (proteína accesorio de polimerasa)

65 La mezcla se incuba a 37 °C durante 30 min. Luego se añaden 10 u de T4 ADN ligasa y la incubación a 37 °C se reanuda durante 30 min. La polimerasa y la ligasa se inactivan por incubación de la reacción a 70 °C durante 15 min.

Para digerir el gen con Xba I, a la reacción se añaden 50 µl de 2 X BSA que contiene TA a 200 µg/ml y DTT a 1 mM, 43 µl de agua y 50 u de Xba I en 5 µl. La reacción se incuba durante 3 h a 37 °C, y luego se purifica sobre un gel. El fragmento Xba I se purifica a partir de un gel y se clona en el sitio Xba I del plásmido pUC19 mediante procedimientos convencionales. Los plásmidos se purifican usando técnicas convencionales y se secuencian usando el procedimiento de dideoxi.

La construcción de plásmidos para expresar cadenas ligeras y pesadas humanizadas se lleva a cabo aislando los fragmentos Xba I de la cadena ligera y pesada del plásmido pUC 19 en el que se había insertado y luego insertándolo en el sitio Xba I de un vector de expresión apropiado que expresará altos niveles de una cadena pesada completa cuando se transfecta en una célula huésped apropiada.

Síntesis y afinidad de anticuerpo humanizado

Los vectores de expresión se transfectan en células Sp2/0 de ratón, y las células que integran los plásmidos se seleccionan basándose en el (los) marcador(es) de selección conferido(s) por los vectores de expresión mediante procedimientos convencionales. Para verificar que estas células secretaron anticuerpo que se une a PRLR, el sobrenadante de las células se incuba con células que se sabe que expresan PRLR. Después de lavar, las células se incuban con anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con fluoresceína, se lavan y se analizan para fluorescencia sobre un citofluorímetro FACSCAN.

Las células que producen el anticuerpo humanizado se cultivan *in vitro*. El anticuerpo humanizado se purifica a homogeneidad sustancial a partir de los sobrenadantes de células por pase a través de una columna de afinidad de proteína A (Pro-Chem Inc., Littleton, MA o equivalente) según técnicas convencionales. La afinidad del anticuerpo humanizado con respecto al anticuerpo murino original se determina según técnicas conocidas en la técnica.

Ejemplo 10

Human Engineering™ de anticuerpos murinos

Este ejemplo describe la clonación y expresión de anticuerpos Human Engineered™, además de la purificación de tales anticuerpos y la prueba para actividad de unión.

Diseño de secuencias de Human Engineered™

Se ha descrito Human Engineering™ de dominios variables de anticuerpos por Studnicka [véase, por ejemplo, Studnicka y col., patente de EE.UU. nº 5.766.886; Studnicka y col. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] como un procedimiento para reducir la inmunogenicidad a la vez que se mantiene la actividad de unión de moléculas de anticuerpo. Según el procedimiento, a cada aminoácido de la región variable se le ha asignado un riesgo de sustitución. Las sustituciones de aminoácidos se distinguen por una de las tres categorías de riesgo: (1) cambios de riesgo bajo son aquellos que tienen la mayor probabilidad de reducir la inmunogenicidad con la mínima posibilidad de alterar la unión a antígeno; (2) cambios de riesgo moderado son aquellos que reducirían adicionalmente la inmunogenicidad, pero tienen una mayor posibilidad de afectar la unión a antígeno o el plegamiento de proteínas; (3) residuos de riesgo alto son aquellos que son importantes para la unión o para mantener la estructura del anticuerpo y llevan el mayor riesgo de que se afecte la unión a antígeno o plegamiento de proteínas. Debido a la función estructural tridimensional de prolina, las modificaciones en prolina se consideran generalmente que son al menos cambios de riesgo moderado, aunque la posición sea normalmente una posición de riesgo bajo. La Figura 10 muestra las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y pesada de anticuerpos murinos XHA.06.983, XHA.06.275 y XHA.06.642.

Regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos murinos son Human Engineered™ usando este procedimiento. Los residuos de aminoácidos que son candidatos para modificación según el procedimiento en posiciones de riesgo bajo se identifican alineando las secuencias de aminoácidos de las regiones variables murinas con una secuencia de la región variable humana. Puede usarse cualquier región variable humana, que incluye una secuencia de VH o VL individual o una secuencia de VH o VL consenso humana. Pueden cambiarse los residuos de aminoácidos en cualquier número de las posiciones de riesgo bajo, o en todas las posiciones de riesgo bajo.

Similarmente, residuos de aminoácidos que son candidatos para modificación según el procedimiento en todas las posiciones de riesgo bajo y moderado se identifican alineando las secuencias de aminoácidos de las regiones variables murinas con una secuencia de la región variable humana. Pueden cambiarse los residuos de aminoácidos en cualquier número de las posiciones de riesgo bajo o moderado, o en todas las posiciones de riesgo bajo y moderado.

Preparación de secuencias de anticuerpos Human Engineered™

Se construyen fragmentos de ADN que codifican secuencias de la región V de la cadena pesada y ligera de Human Engineered™, junto con secuencias señal (por ejemplo, secuencias señal derivadas de anticuerpos) usando síntesis

de nucleótidos sintéticos. El ADN que codifica cada una de las secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena ligera descritas en el presente documento se inserta en un vector que contiene la región constante de la cadena ligera kappa o lambda humana. El ADN que codifica cada una de las secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena pesada descritas en el presente documento se inserta en un vector que contiene la región constante de la cadena pesada gamma-1, 2, 3 ó 4 humana. Todos estos vectores contienen un promotor (por ejemplo, promotor del CMVh) y una región sin traducir de 3' (por ejemplo, región sin traducir de 3' kappa de la cadena ligera de ratón) junto con secuencias reguladoras adicionales, dependiendo de su uso para expresión transitoria o desarrollo de líneas celulares estables (documento US 2006/0121604).

Para la expresión de anticuerpos Human Engineered™ usando los vectores anteriormente mencionados que contienen secuencias de la región variable, al menos cuatro variantes pueden generarse a partir de diferentes combinaciones de cadena ligera de riesgo bajo, cadena ligera de riesgo bajo + moderado, cadena pesada de riesgo bajo y cadena pesada de riesgo bajo + moderado. En aquellos casos en los que los cambios de riesgo moderado no estén incluidos en cualquiera o ambas de la cadena ligera o cadena pesada, menos variantes se producen correspondientemente.

Preparación de vectores de expresión para expresión transitoria

Los vectores que contienen tanto genes de la cadena ligera como pesada descritos anteriormente también se construyen para transfección transitoria. Además de las secuencias de anticuerpos Human Engineered™, promotor y región sin traducir de 3' de la cadena ligera descritos anteriormente, estos vectores contienen preferentemente el *oriP* del virus de Epstein-Barr para replicación en células HEK293 que expresan el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr.

Expresión transitoria de anticuerpo para PRLR Human-Engineered™ en células HEK293E

Vectores separados que contiene cada uno *oriP* del virus de Epstein-Barr y genes de la cadena ligera o cadena pesada descritos anteriormente se transfectan transitoriamente en células HEK293E como se describe en el documento US 2006/0121604. Células transitoriamente transfectadas se dejan incuban durante hasta 10 días después de que el sobrenadante se recupere y el anticuerpo se purifica usando cromatografía en proteína A.

Preparación de vectores de expresión para el desarrollo de líneas celulares permanentes

Además de las secuencias de anticuerpos Human Engineered™, promotor y región sin traducir de 3' de la cadena ligera descritos anteriormente, vectores para el desarrollo de líneas celulares permanentes contienen los genes de marcadores de selección tales como *neo* o *his* para la selección de transfectantes resistentes a G418 - o histidinol -, respectivamente. Se construye un vector final que contiene una copia de la cadena pesada y una copia de las regiones codificantes de la cadena ligera.

Desarrollo de células CHO-K1 permanentemente transfectadas

Los vectores descritos anteriormente que contiene una copia cada uno de los genes ligeros y pesados juntos se transfectan en células CHO-K1 adaptadas a Ex-Cell 302. Las células CHO-K1 adaptadas a crecimiento en suspensión en medio Ex-Cell 302 se transfectan normalmente con vector linealizado usando polietilenimina lineal (PEI). Las células se siembran en placas de 96 pocillos que contienen medio Ex-Cell 302 complementado con 1 % de SBF y G418. Los clones se seleccionan en placas de 96 pocillos y ~10 % de los clones superiores de cada transfección se transfieren a placas de 96 pocillos profundas que contienen medio Ex-Cell 302 complementado con G418.

Se realiza una prueba de productividad en placas de 96 pocillos profundas en medio Ex-Cell 302 para cultivos cultivados durante 7 y 14 días en el momento en el que los sobrenadantes de cultivo se prueban para niveles de anticuerpo secretado por un ensayo de ELISA de inmunoglobulina para IgG.

Los clones superiores se transfieren a matraces con agitación que contienen medio Ex-Cell 302. Se realizan pruebas en matraz con agitación con estos clones en medio Ex-Cell 302. Las células se cultivan durante 14 días en matraces Erlenmeyer de 125 ml que contienen 25 ml de medio. Los niveles de polipéptido de inmunoglobulina en el medio de cultivo se determinan por ELISA o HPLC de IgG al final del periodo de incubación. Múltiples transfecciones secuenciales de la misma línea celular con dos o tres vectores de transcripción de multi-unidad producen clones y líneas celulares que presentan más aumentos en los niveles de producción de inmunoglobulina, preferentemente a 300 µg/ml o más.

Purificación

Puede diseñarse un procedimiento para la purificación de polipéptidos de inmunoglobulina a partir de vectores y todas las líneas según la invención (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0121604). Por ejemplo, según procedimientos muy conocidos en la técnica, las células se extraen por filtración después de la terminación. El

filtrado se carga sobre una columna de proteína A (en múltiples pases, si se necesita). La columna se lava y luego los polipéptidos de inmunoglobulina expresados y secretados se eluyen de la columna. Para la preparación del producto de anticuerpo, el conjunto de proteína A se mantiene a un pH bajo (pH 3 durante un mínimo de 30 minutos y un máximo de una hora) como etapa de inactivación viral. A continuación se usa una etapa de intercambio catiónico adsorbtivo para purificar adicionalmente el producto. El eluato de la columna de separación adsorbtiva se pasa a un filtro de retención de virus para proporcionar eliminación adicional de posibles partículas virales. El filtrado se purifica adicionalmente pasando a través de una columna de intercambio aniónico en la que el producto no se une. Finalmente, el procedimiento de purificación finaliza transfiriendo el producto al tampón de formulación mediante diafiltración. El concentrado se ajusta a una concentración de proteína de al menos 1 mg/ml y se añade un estabilizador.

Actividad de unión

Se evalúa la actividad de unión de PRLR de los anticuerpos Human Engineered™ recombinantes. Se purifica proteína de los sobrenadantes de cultivo de los matraces con agitación por pase sobre una columna de proteína A, seguido de determinación de la concentración por A₂₈₀. Se realizan ensayos de unión como se ha descrito en otros ejemplos.

Ejemplo 11

Anticuerpos Human engineered

Tres de los anticuerpos murinos anteriormente mencionados fueron Human Engineered™ generalmente como se describe en el Ejemplo 10.

Human Engineering™ de los anticuerpos para receptor de prolactina XHA.06.642 y XHA.06.275

Para XHA.06.642, la cadena pesada fue Human Engineered™ en tanto las posiciones 11 de riesgo bajo como 13 de riesgo bajo más moderado; la cadena ligera fue Human Engineered™ solo en las posiciones de riesgo bajo (14 cambios) debido a que todas las posiciones de riesgo moderado ya eran aminoácidos humanos. Para XHA.06.275, la cadena pesada fue Human Engineered™ en tanto las posiciones 7 de riesgo bajo como 11 de riesgo bajo más moderado; la cadena ligera fue Human Engineered™ en tanto las posiciones 8 de riesgo bajo como 10 de riesgo bajo más moderado.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de Human-Engineered™ derivadas de XHA.06.642, XHA.06.275 y XHA.06.983 se muestran a continuación (CDR subrayados). Estas regiones variables se ensamblaron en diversas combinaciones (por ejemplo, SEC ID N°: 88 y SEC ID N°: 89; SEC ID N°: 88 y SEC ID N°: 90; SEC ID N°: 91 y SEC ID N°: 93; SEC ID N°: 91 y SEC ID N°: 94; SEC ID N°: 92 y SEC ID N°: 93; o SEC ID N°: 92 y SEC ID N°: 94) para generar los anticuerpos Human-Engineered™ he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4.

he.06.642 Región Variable de la LC de Riesgo Bajo (SEQ ID NO: 88):

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSVSTSGYTYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASN
RESGVLPDRFSGSGSGTDFTLTISPVAEDVATYYCQHSGLPPSFQGGTKLEIK

he.06.642 Región Variable de la HC de Riesgo Bajo (SEQ ID NO: 89):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQAPGKRLEWVATVSSGGT
YTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHRGNYYATYYYAM
DYWGQGT LVT VSS

he.06.642 Región Variable de la HC de Riesgo Bajo+Moderado (SEQ ID NO: 90):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATVSSGGT
YTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRGNYYATYYYAM
DYWGQGT LVT VSS

he.06.275 Región Variable de la LC de Riesgo Bajo (SEQ ID NO: 91):

DVQITQSPSSLSASPGDRITLTCRASKNIYKYLA WYQEKPGKTNLLIYSGSTLHSGIP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAMYYCQQHNDYPYTFGQGTKLEIK

he.06.275 Región Variable de la LC de Riesgo Bajo+Moderado (SEQ ID NO: 92):

DVQITQSPSSLSASPGDRITLTCRASKNIYKYLA^{WYQ}KEKPGKANKLLIYSGSTLHSGIP
SRFSGSGSGTDFTLT^{ISS}LQPEDFAMY^{YCQ}QHNDYPYTFGQGTKLEIK

he.06.275 Región Variable de la HC de Riesgo Bajo (SEQ ID NO: 93):

DVQLQESGPGLVKPSQTL^{SLTCTVT}GY^{SITSDY}AWN^{WIRQ}FPGKKLEWMGYISYSGS
TSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYFCARDYGYVFDYWGQGTTLT
VSS

he.06.275 Región Variable de la HC de Riesgo Bajo+Moderado (SEQ ID NO: 94):

QVQLQESGPGLVKPSQTL^{SLTCTV}SGY^{SITSDY}AWN^{WIRQ}FPGKGLEWMGYISYSGS
TSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYFCARDYGYVFDYWGQGTTLT
VSS

he.06.983 Región Variable de la LC de Riesgo Bajo (SEQ ID NO: 95):

DIVMTQSPDSLAVSAGERVTINCKASQGV^{SNDVA}WFQKPGQSPKLLIYSASTRYT^G
VPDRLSGSGSGTDFTFTISSVQAEDVAVYFCQQDYTSPTFGQGTKLEIK

he.06.983 Región Variable de la LC de Riesgo Bajo+Moderado (SEQ ID NO: 96):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKASQGV^{SNDVA}WFQKPGQSPKLLIYSASTR^{ESG}
VPDRLSGSGSGTDFTFTISSVQAEDVAVYFCQQDYTSPTFGQGTKLEIK

he.06.983 Región Variable de la HC de Riesgo Bajo (SEQ ID NO: 97):

DVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFAFS^{SFGM}QWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS
TIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRSGRDYWGQGTTLT
VSS

he.06.983 Región Variable de la HC de Riesgo Bajo+Moderado (SEQ ID NO: 98):

EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFAFS^{SFGM}QWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS
TIYYADSVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRSGRDYWGQGTTLTV
SS

Ejemplo 12

Expresión y purificación de anticuerpos he.06.642 y he.06.275

Las regiones V de la cadena ligera y pesada de Human Engineered™ he.06.642 y he.06.275 se fusionaron con las regiones constantes kappa y gamma-1 o gamma-2 humanas, respectivamente. Entonces, los genes de la cadena pesada y ligera se fusionaron con un promotor fuerte y la eficaz región sin traducir de 3' y se clonaron en vectores de expresión transitorios que contenían el origen de replicación del virus de Epstein-Barr.

Los anticuerpos se expresaron transitoriamente en células HEK293 usando plásmidos separados que codificaban secuencias de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo en las diversas combinaciones de riesgo bajo o bajo + moderado como se describe generalmente en el Ejemplo 10. La relación de ADN de cadena pesada:cadena ligera fue 1:2. La transfección de células se realizó con PEI a una relación de ADN:PEI de 1:2 y una concentración de ADN de 1 ug/ml. La densidad celular fue 8e5 células/ml. El ADN se preparó usando kits de Qiagen convencionales. Los cultivos de expresión se cultivaron en medio IS293 (Irvine Scientific) + 1 % SBF de Ig baja (Hyclone) en matraces de 2 l con 400 ml de medio por matraz. Las condiciones de cultivo fueron 37 °C, 5 % de CO₂ y agitación a 90-95 rpm.

Después de 5-7 días en cultivo, el medio de cultivo se recogió y se aclaró como entrada a la purificación.

La purificación de versiones quiméricas y de Human Engineered™ de los anticuerpos anteriormente mencionados se logró en una única etapa pasando sobrenadante de cultivo de expresión transitoria directamente sobre una columna Fast Flow de proteína recombinante A (GE Healthcare). La elución del pico principal fue por glicina 0,1 mM a pH 3,5. El material reunido se dializó en PBS y se concentró en concentradores centrífugos con un corte de peso molecular nominal de 30 kD. Las purezas finales fueron >95 % y los rendimientos globales fueron aproximadamente del 60 %. Los conjuntos finales se ensayaron para endotoxina usando una unidad Endosafe PTS LAL (Charles River) o el ensayo QCL-1000 Chromogenic LAL Endpoint (Lonza), y los resultados fueron <0,05 UE/mg (por debajo del límite de detección) para todos los anticuerpos. Se determinó que el estado de agregación del anticuerpo quimérico he.06.642-2 era monomérico por SEC sobre una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare).

chXHA.06.642 se aísla a una pureza de >95 % en una única etapa cromatográfica, seguido de diálisis para el intercambio de tampón. chXHA.06.642 es soluble en PBS a 3 mg/ml y no se detectan impurezas importantes o agregación como se mide por cromatografía de exclusión por tamaño.

Prueba de anticuerpos anti-PRLR humano Human Engineered por citometría de flujo

Células CHO-K1 que expresan receptor de prolactina (PRLR) parental y humano se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron a aproximadamente 5×10^6 células/ml en 1X PBS que contenía 2 % de SBF y 0,1 % de azida de sodio (tampón FACS). Se diluyeron anticuerpos anti-PRLR humano y de control de isotipo anti-KLH Human Engineered a 2X concentración final en tampón FACS y se añadieron a pocillos de muestra apropiados (50 ml/pocillo). Para el anticuerpo secundario y controles de autofluorescencia, 50 ml de tampón de FACS se añadieron a pocillos apropiados. 50 ml de suspensión de células se añadió a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 1 hora, se lavaron 2X con tampón de FACS frío y se resuspendieron en tampón de FACS que contenía anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugada con PE (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a una dilución 1:100. Tras una incubación de 30 minutos a 4 °C, las células se lavaron 2X con tampón de FACS frío, se resuspendieron en tampón de FACS que contenía 1 mg/ml de yoduro de propidio (Invitrogen, San Diego, CA) y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Tabla 7, los anticuerpos anti-PRLR se unen a las células que expresan PRLR, pero no a las células parentales.

Tabla 8

Línea Celular de PLRL, clon 1G5		Línea Celular Parental de CHO-K1	
Muestra	MFI:	Muestra	MFI:
Auto. control, 1G5	2.51	Auto. control, IG5	2.66
GAH-PE, 1G5	2.6	GAH-PE, PAR	2.54
GAM-PE, 1G5	2.61	GAM-PE, PAR	2.58
MAB1167, 1G5	33.8	MAB1167, PAR	2.58
KLH8.G2, 1G5	2.75	KLH8.G2, PAR	2.66
he.06.642 3 G2, 1G5	38.5	he.06.642-3 G2, PAR	2.58
KLH8.G1, 1G5	2.69	KLH8.G1, PAR	2.59
he.06.642 3 G1 (1), 1G5	39.1	he.06.642 3 G1 (1), PAR	2.57
he.06.642 3 G1 (2), 1G5	43	he.06.642 3 G1 (2), PAR	2.55
chXHA.06.642(1), 1G5	37.3	chXHA.06.642 (1), PAR	2.56
chXHA.06.642 (2), 1G5	37.3	chXHA.06.642 (2), PAR	2.55

Ejemplo 13

Afinidad de anticuerpos Human Engineered™

La afinidad de los anticuerpos quimerizados y Human Engineered™ se determinó por análisis Biacore. Brevemente, se usó un chip sensor CM5 (Biacore) inmovilizado con proteína A/G (Pierce) mediante NHS/EDC para capturar aproximadamente 600 UR de anticuerpo sobre la superficie del chip. Se inyectaron cinco concentraciones de DEC de PRLR a partir de 5 ug/ml (185 nM) y se diluyeron sucesivamente a 5x dilución a 0,3 nM desde la concentración más baja hasta la más alta en el modo de inyección de valoración cinética, y se recogieron 15 minutos de datos de disociación. Los experimentos se referenciaron por duplicado, es decir, una respuesta de la celda de flujo adyacente

se restó automáticamente, y la respuesta de un experimento de inyección de tampón se restó del conjunto de datos experimentales. Los parámetros cinéticos y derivados (k_a , k_d y K_D) se determinaron ajustando a un modelo de Langmuir 1:1 usando el software BiaEval personalizado al modo de inyección de valoración cinética. Las mediciones de afinidad de tanto anticuerpos quiméricos como todos los Human Engineered™ contra DEC de PRLR humano y cinomolgo se resumen en la Tabla 9 y la Tabla 10.

Tabla 9

Muestra	KD	kd	ka	Chi2
chXHA.06.275 Humana	3.9E-10	2.7E-04	7.0E+05	0.574
he.06.275-1 Humana	6.1E-10	3.7E-04	6.2E+05	0.594
he.06.275-2 Humana	4.3E-10	2.7E-04	6.0E+05	0.532
he.06.275-3 Humana			6.4E+05	0.555
he.06.275-4 Humana	5.2E-10	3.2E-04	6.2E+05	0.69
chXHA.06.275 Cino	1.2E-09	5.0E-04	4.3E+05	1.48
he.06.275-1 Cino	1.6E-09	5.7E-04	3.6E+05	2.78
he.06.275-2 Cyno	1.9E-09	6.9E-04	3.7E+05	1.49
Muestra	KD	kd	ka	Chi2
he.06.275-3 Cino	1.3E-09	5.0E-04	3.9E+05	1.19
he.06.275-4 Cino	1.7E-09	6.0E-04	3.6E+05	1.2
Muestra	KD	kd	ka	Chi2
chXHA.06.642 Humana	1.3E-09	4.6E-04	3.5E+05	5.15
he.06.642-1 Humana	2.0E-09	3.5E-04	1.7E+05	12.9
he.06.642-2 Humana	3.1E-09	5.3E-04	1.7E+05	12.6
chXHA.06.642 Cino	26E-08	4.3E-03	1.7E+05	12.6
he.06.642-1 Cino	3.1E-08	3.8E-03	1.2E+05	8.29
he.06.642-2 Cino	4.7E-08	8.3E-03	1.8E+05	11.1

Tabla 10

Muestra	ka	kd	KD	Res SD
he.06.642 3 -G1 lot1	1.038(1)e5	3.828(5)e-4	3.688(5)nM	0.977
he.06.642 3 -G1 lot2	1.02E+5	3.88E-4	3.79977nM	1.06
he.06.642 3 -G2	9.801(1)e4	4.210(7)e-4	4.296(6)nM	1.054
chXHA.06.642	1.962(3)e5	6.47E-04	3.296(5)nM	1.389
CHO.KLHG2-60	No unión	No unión	No unión	No unión

Con el fin de comparar la reactividad cruzada de rata y ratón usando anticuerpos covalentemente inmovilizados, un chip CM4 se acopló a los anticuerpos he.06.642-2 y he.06.275-4 mediante químicas de acoplamiento de EDC-NHS-amina convencionales según el protocolo recomendado de Biacore® Inc. Las inyecciones de DEC de PRLR se realizaron a cinco concentraciones en una serie de valoración de tres veces a partir de 111 nM y disminuyendo hasta 1,37 nM. La regeneración se realizó con glicina a pH3,0. La afinidad de todas las variantes de HE de XHA.06.642 y XHA.06.275 son muy similares a la afinidad del anticuerpo quimérico parental. El anticuerpo he.06.642-2 se une a PRLR humano, de ratón y rata con afinidad equivalente. Se une a PRLR de cinomolgo con afinidad 15 veces más débil que PRLR humano. El anticuerpo he.06.275-4 se une a PRLR de cinomolgo con afinidad 5 veces más débil

que PRLR humano. El anticuerpo he.06.275-4 no se une eficazmente a PRLR de ratón o de rata. Un resumen de los datos se proporciona en la Tabla 11.

Tabla 11 - Análisis de la afinidad de especies cruzadas de variantes de HE seleccionadas sobre anticuerpos covalentemente inmovilizados

Resultados de he.06.642-2			
Muestra	kon	koff	KD (nM)
he.06.642-2 Humana	3.5E+05	9.1E-04	2.6
he.06.642-2 Cino	1.5E+05	6.0E-03	38.9
he.06.642-2 Murina	1.1E+05	3.1E-04	2.7
he.06.642-2 Rata	7.6E+04	1.4E-04	1.9
he.06.275-4 Humana	3.4E+05	4.5E-04	1.3
he.06.275-4 Cino	1.3E+05	8.2E-04	6.4
he.06.275-4 Murina	2.1E+03	3.7E-02	17,613
he.06.275-4 Rata	0.0E+00	0.0E-00	0
KD Cino / KD Humana = 15 KD Murina / KD Humana = 1 KD Rata / KD Humana = 0.75			

Ejemplo 14

Inhibición de la proliferación y supervivencia celular de BaF/PRLR e inhibición de la fosforilación de ERK1/2 inducida por PRLR

Se analizaron mAb quiméricos para su capacidad para inhibir la proliferación y supervivencia de células BaF/PRLR [Figura 11]. Se encontró que todas las quimeras probadas habían retenido sus potencias con respecto a sus clones de hibridomas correspondientes. En realidad, se encontró que XHA.06.642 y XHA.06.275 habían ganado potencia en este ensayo tras la quimerización. Con el fin de evaluar la capacidad neutralizante de señales de PRLR de los anticuerpos quiméricos en un modelo de cáncer de mama humano, células T47D se trataron con 1 ug/ml de mAb durante 30 min antes de la estimulación de PRL. Al mismo tiempo, muestras de células adicionales se incubaron con anticuerpo solo para examinar cualquier posible agonismo ganado mediante la quimerización de los candidatos a anticuerpo. Como puede apreciarse en la Figura 12, todos los anticuerpos quiméricos retuvieron su capacidad para bloquear la señalización inducida por PRL en T47D, mientras que solo chXHA.06.983 mostró inducción detectable de la señalización de PRLR (un efecto pequeño pero reproducible) representada por fosfo-PRLR y fosfo-Stat5.

Determinación del efecto de anticuerpos sobre la fosforilación de ERK1/2

Se probaron anticuerpos Human Engineered™ seleccionados para su capacidad para inhibir la fosforilación de ERK1/2 inducida por PRLR, como se describe más adelante y en el Ejemplo 5 anterior.

Tras una privación de suero de 5 horas, células T47D se sembraron en placas de microtitulación en medio de crecimiento completo durante 24 horas a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con anticuerpos diluidos en medio sin suero que contenía 0,1 % de BSA durante 30 minutos a 37 °C. La concentración de partida final de los anticuerpos fue 40 ug/ml. El medio se eliminó y se añadió prolactina diluida en medio sin suero que contenía 0,1 % de BSA a una concentración final de 30 ng/ml. Las células se incubaron con prolactina durante 30 minutos a 37 °C, seguido de dos lavados con PBS helado. Se añadió tampón de lisis convencional que contiene detergentes, quelantes y diversos inhibidores de proteasa y fosfatasa para generar los lisados celulares. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) se midieron usando ELISA convencional según las instrucciones de DUOSET® IC Phospho-ERK1/ERK2, R&D Systems, Inc. Los resultados de un ensayo representativo se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 15

A. Capacidad de candidatos a mAb para mediar en ADCC contra células diana que expresan PRLR.

Uno de los mecanismos de acción previstos de mAb anti-PRLR es la capacidad para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Con el fin de evaluar la capacidad para ADCC de candidatos a

anticuerpos, las células T47D se emplearon como dianas epiteliales de mama que expresan PRLR. Como se muestra en la Figura 14, dos de los mAb anti-PRLR quiméricos pueden inducir ADCC mediada por células NK humanas purificadas. Se demostró que chXHA.06.275 inducía aproximadamente el 30 % de lisis específica de células diana en el plazo de 4 h. Debido al tiempo de generación prologando de chXHA.06.642, este candidato no se incluyó en los ensayos de ADCC originales.

B. Efecto de anticuerpos anti-PRLR sobre los niveles de citocinas.

Se investigó la posible regulación de citocinas por PRL en células de cáncer de mama. En este experimento, células MCF7 o T47D se expusieron a PRL con o sin chXHA.06.642 durante un periodo de 48 h. Se empleó un inmunoensayo múltiple de sándwich de MesoScale Diagnostics con el fin de medir los efectos de chXHA.06.642 sobre las posibles citocinas reguladas por PRL. Se encontró que PRL inducía la secreción de VEGF de células T47D, y que este efecto se abolía completamente con la adición de anticuerpo chXHA.06.642. No se detectó regulación significativa de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ o TNF- α por PRL o mAb anti-PRLR en estos experimentos. Estos resultados sugieren que la ruta de PRL/PRLR puede contribuir a la angiogénesis, además de al crecimiento y supervivencia celular en tumores de mama y que la inhibición de esta ruta reguladora de VEGF puede ser otro posible mecanismo de acción *in vivo* para un anticuerpo terapéutico anti-PRLR.

C. Estudios de combinación *in vitro* que utilizan mAb anti-PRLR y quimioterapéuticos.

Debido a la posibilidad de que un posible anticuerpo terapéutico anti-PRLR pueda administrarse conjuntamente con pautas de fármacos citotóxicos en la clínica, se investigaron los efectos de tales terapias de combinación sobre la supervivencia celular en cultivo. Para este fin, células BaF3/PRLR se trataron con chXHA.06.642 o chXHA.06.275 a diversas concentraciones en paralelo con quimioterapéuticos durante 5 días, después de lo cual la supervivencia celular se evaluó usando CellTiterGlo como marcador del número de células. En este ensayo se utilizó una matriz de agentes citotóxicos clínicamente relevante y mecanísticamente diversa: Doxorubicina (un inhibidor de Topo II de antraciclinas), taxol (un agente estabilizante de microtúbulos), fludarabina (un antimetabolito) y cisplatino (un fármaco de reticulación de ADN basado en platino). Se encontró que chXHA.06.275 y, a un mayor grado, chXHA.06.642, sinergiza con doxorubicina para potenciar la muerte celular en células BaF/PRLR [Véase la Figura 15]. Las diferencias resultantes en valores de CI_{50} quimioterapéutico con y sin el mAb anti-PRLR chXHA.06.642 y chXHA.06.275 se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12

Fármaco Citotóxica	KLH (1ug/ml)	chXHA.06.642 (1ug/ml)	chXHA.06.275 (1ug/ml)
Doxorrubicina	6.44 nM	2.14 nM	2.56 nM
Taxol	4.14 nM	2.07 nM	2.45 nM
Fludarabina	104.6 uM	40.0 uM	93.8 uM
Cisplatino	165.5 nM	27.6 nM	46.8 nM

D. Actividad funcional anti-PRLR de mAb anti-PRLR.

Los anticuerpos se evaluaron en ensayos de modulación de dianas y proliferación celular. La Figura 16 representa el efecto de 2 concentraciones de chXHA.06.642 y los anticuerpos Human Engineered™ he.06.642-1 y he.06.642-2 sobre la fosforilación de Stat5 inducida por PRL en células T47D. Ambos retuvieron potentes propiedades antagonistas como es evidente por la completa abolición de señales de p-Stat5. Adicionalmente, ningún anticuerpo mostró actividad agonista ni células tratadas con mAb solo. Se encontraron resultados similares para variantes de chXHA.06.275. Así, Human Engineering™ no afectó las calidades antagonistas o agonistas globales de estos anticuerpos.

Se utilizó el ensayo de proliferación de células BaF/PRLR con el fin de determinar valores de CI_{50} relativos de anticuerpos quiméricos anti-PRLR y Human Engineered™ [véase la Figura 17]. Como resultado de estos experimentos, todos los anticuerpos Human Engineered™ tuvieron potencias aproximadamente equivalentes a homólogos murinos.

Ejemplo 16

Evaluación de la actividad antitumoral de anticuerpo anti-PRLR en un modelo de linfoma de rata Nb2-C11

Se realizó un estudio PD de dosis única con chXHA.06.642 en el modelo de xenoinjerto de tumor Nb2-C11 para determinar si el mAb anti-PRLR podría llegar o no al tumor y bloquear la señalización. Se usó anticuerpo chXHA.06.642 en este estudio basándose en su afinidad por PRLR de rata (descrito anteriormente). El marcador PD monitorizado fue p-STAT5, un mediador aguas abajo de la señalización de PRLR que puede detectarse usando

procedimientos de inmunotransferencia o de IHC. Como los niveles de p-STAT5 de referencia en xenoinjertos de tumor Nb2-C11 fueron demasiado bajos para detectarlos adecuadamente, los ratones recibieron estimulación de (o)PRL ovina exógena para aumentar los niveles de p-STAT5 de referencia, y así proporcionar un intervalo dinámico más adecuado.

La inducción de p-STAT5 se detectó por análisis Western y de IHC en animales que llevaban tumores Nb2-Cc11 inyectados con PRL ovina en comparación con el control inyectado con solución salina [véanse las Figuras 18A y B]. La inhibición de p-STAT5 se observó en ratones tratados con 10 mg/kg de chXHA.06.642 48 horas antes de la inyección de oPRL y no en los animales de control tratados con KLH-IgG1.

Para determinar si la inhibición de la señalización de PRLR se correlaciona o no con la inhibición del crecimiento de tumores Nb2-C11 se realizó un estudio de eficacia de múltiples dosis con administración de una vez a la semana de chXHA.06.642 [véase la Figura 19A y B]. La dosificación se inició 4 días después de la implantación de células (antes de que los tumores fueran palpables) con chXHA.06.642 o KLH-IgG1 a 10 mg/kg, o un control de solución salina. Se administraron cuatro dosis intraperitoneales semanales de mAb. El modelo empleó una supervivencia condicional o tiempo hasta el punto final de progresión, ya que estos tumores invaden el músculo y así son difíciles de medir con exactitud con compases calibradores. Los tumores en el grupo tratado con chXHA.06.642 no se detectaron hasta aproximadamente 11 semanas después de la implantación (7,5 semanas después de la 4ª dosis de mAb), cuando dos de los 15 animales en este grupo sucumbieron a la carga tumoral. La mediana de la supervivencia en los grupos tratados con solución salina y con control de KLH-IgG1 fue 20 días después de la implantación de células ($p < 0,0001$), momento en el que los animales se sacrificaron debido a la carga tumoral. Los animales en el grupo tratado con chXHA.06.642 ganaron peso corporal mientras que los animales de control mantuvieron o perdieron peso corporal, supuestamente debido a la carga de enfermedad.

Se incluyó un segundo brazo de eficacia en este estudio, en el que animales con tumores establecidos se enrolaron en el estudio 12 días después de la implantación de células [véase la Figura 20A y B]. La media de los volúmenes tumorales fueron 135 mm^3 en el momento de iniciar la dosificación. Los animales se dosificaron intraperitonealmente con 10 mg/kg una vez a la semana con tanto anticuerpos chXHA.06.642 como de control de KLH-IgG1 durante 2 dosis. Pareció que los tumores revirtieron completamente dos días después de la 2ª dosis (3 semanas después de la implantación). Sin embargo, aproximadamente dos semanas después, los tumores empezaron a reaparecer en los ratones. En comparación, los animales de control de KLH-IgG1 tuvieron una carga tumoral grande, que tuvo un volumen medio de $> 600 \text{ mm}^3$. Como estos tumores crecieron directamente en el músculo, el volumen tumoral medio puede ser mayor que el registrado por las mediciones con compás calibrador. La mediana de la supervivencia en tanto los grupos de solución salina como de KLH-IgG1 fue 23 días después de la implantación de células ($p = 0 < 0,0001$). Como en el estudio inicial, los animales en el grupo tratado con chXHA.06.642 ganaron peso corporal, mientras que los animales de control mantuvieron o perdieron peso corporal. Así, el mAb chXHA.06.642 fue eficaz contra no solo un bajo número de células tumorales (inicio del tratamiento 4 días después del implante), sino que también pudo revertir completamente los agresivos tumores Nb2-C11 establecidos durante más de 2 semanas.

El modelo de Nb2-C11 ha demostrado que un mAb anti-PRLR tiene la capacidad de elegir eficazmente como diana tumores que expresan antígeno *in vivo*, inhibir la señalización accionada por PLR dentro del tumor e inducir un resultado medible en la carga tumoral, incluso cuando el animal tiene un tumor establecido agresivo.

Ejemplo 17

Modelo de T47D de carcinoma de mama humano para la evaluación PD

Se realizó un estudio PD de dosis única *in vivo* con el anticuerpo chXHA.06.642 probado en el Ejemplo 16 usando células T47D de carcinoma de mama. Se evaluó la capacidad de oPRL para estimular la señalización de PRLR, además de la capacidad de chXHA.06.642 para inhibir esta señalización *in vivo*. Animales implantados con tumores recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina, mAb de control de KLH-IgG1 o chXHA.06.642, y 48 horas después recibieron tanto solución salina como 20 ug de oPRL mediante inyección en bolo. Cuarenta minutos después se recogieron los tejidos tumorales. Se observó una inducción significativa de p-STAT5 en tumores de los animales tratados en bolo con oPRL, pero no en los animales de control de solución salina, como se evalúa por transferencia Western, aunque es ligeramente más variable por análisis de IHC (Figura 21). Los niveles de p-AKT y p-ERK no aumentaron por estimulación con oPRL *in vivo*. Significativamente, el tratamiento con chXHA.06.642, pero no el control de KLH-IgG1, demostró una fuerte inhibición de la inducción de p-STAT5 después de la inyección en bolo de oPRL. Los análisis de IHC generalmente confirman este resultado. Significativamente, p-STAT5 se inhibió en tumores en 4 de los 4 animales tratados con chXHA.06.642 por tanto análisis de transferencia Western como de IHC.

Ejemplo 18

Expresión de PRLR y correlación de la expresión de PRLR con la expresión de ER y Her2-neu

En tejidos normales, la expresión de PRLR, como se cuantifica por RT-PCR, es mayor en mama y útero, seguido de

riñón, hígado, próstata y ovario. Los niveles de ARNm de PRLR son menores en tráquea, cerebro y pulmón (Pierce SK, y col., J Endocr; 171 (1):R1-R4 (2001)).

Pueden llevarse a cabo análisis inmunohistoquímicos (IHC) del siguiente modo. Muestras de tejido congeladas de pacientes con cáncer se incorporan en un compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) y se congelan rápidamente en isopentano con nieve carbónica. Las criosecciones se cortan con un micrótopo Leica 3050 CM al espesor de 5 µm y se montan congeladas sobre portaobjetos recubiertos con Vectabond. Las secciones se fijan con etanol a -20 °C y se dejan secar al aire durante la noche a temperatura ambiente. Las secciones fijadas se almacenan a -80 °C hasta uso. Las secciones de tejido se recuperan y primero se incuban en tampón de bloqueo (PBS, 5 % de suero de cabra normal, 0,1 % de Tween 20) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se incuban con el anticuerpo monoclonal específico de la proteína asociada al cáncer y anticuerpos monoclonales de control diluidos en tampón de bloqueo (1 µg/ml) durante 120 minutos. Las secciones se lavan entonces tres veces con el tampón de bloqueo. Los anticuerpos monoclonales unidos se detectan con un conjugado de F(ab')₂-peroxidasa de cabra anti-IgG + IgM de ratón (H+L) y el sustrato de peroxidasa diaminobencidina (1 mg/ml, n° de catálogo de Sigma D 5637) en tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5,05 y 0,003 % de peróxido de hidrógeno (n° de catálogo de Sigma H1009). Los portaobjetos teñidos se contratiñen con hematoxilina y se examinan bajo microscopio Nikon.

Se usa anticuerpo monoclonal contra una proteína asociada al cáncer (antígeno) para probar la reactividad con diversas líneas celulares de diferentes tipos de tejidos. Las células de diferentes líneas celulares establecidas se eliminan de la superficie de crecimiento sin usar proteasas, se envasan y se incorporan en el compuesto OCT. Las células se congelan y se seccionan, luego se tiñen usando un protocolo de IHC convencional. La tecnología CellArray™ se describe en el documento WO 01/43869. Tejido normal (humano) obtenido por resección quirúrgica se congela y se monta. Las criosecciones se cortan con un micrótopo Leica 3050 CM al espesor de 5 µm y se montan congeladas sobre portaobjetos recubiertos con Vectabond. Las secciones se fijan con etanol a -20 °C y se dejan secar al aire durante la noche a temperatura ambiente. Se usa el kit de detección PolyMICA™ para determinar la unión de un anticuerpo monoclonal específico para antígeno asociado al cáncer para tejido normal. Se usa anticuerpo monoclonal primario a una concentración final de 1 µg/ml.

Con el fin de investigar la incidencia de la expresión de PRLR y su correlación con la expresión de ER y Her2-neu se evaluaron 122 muestras de pacientes con cáncer de mama invasivo usando inmunohistoquímica (IHC). En general, 62/122 (50 %) de las muestras expresaron PRLR, 58/122 (47 %) expresaron ER y 32/122 (26 %) expresaron Her2-neu. Noventa y seis (78 %) de las muestras consistieron en carcinoma ductal invasivo, de las que 48 (50 %) expresaron PRLR. Entre estas muestras, 24/48 (50 %) también expresaron ER+ y 13/48 (26 %) también Her2-neu.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bedinger, et al.

<120> PRLR-Anticuerpos Específicos y Usos de los Mismos

<130> 27527/43177

<150> 60/838648

<151> 2006-08-18

<150> 60/946360

<151> 2007-06-26

<160> 98

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1846

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

	atgaaggaaa atgtggcatc tgcaaccgtt ttactctctgc tactttttct caacacctgc	60
	cttctgaatg gacagttacc tcctggaaaa cctgagatct tttaatgtcg ttctcccaat	120
5	aaggaaacat tcacctgctg gtggaggcct gggacagatg gaggacttcc taccaattat	180
	tcactgactt accacaggga aggagagaca ctcatgcatg aatgtccaga ctacataacc	240
10	ggtggcccca actcctgcca ctttggcaag cagtacacct ccatgtggag gacatacatc	300
	atgatgggtca atgccactaa ccagatggga agcagtttct cggatgaact ttatgtggac	360
	gtgacttaca tagttcagcc agaccctcct ttggagctgg ctgtggaagt aaaacagcca	420
15	gaagacagaa aaccctacct gtggattaaa tggctctccac ctaccctgat tgacttaaaa	480
	actggttgggt tcacgctcct gtatgaaatt cgattaaaac ccgagaaagc agctgagtgg	540
20	gagatccatt ttgctgggca gcaaacagag tttaagattc tcagcctaca tccaggacag	600
	aaataccttg tccaggttcg ctgcaaacca gaccatggat actggagtgc atggagtcca	660
25	gcgaccttca ttcagatacc tagtgacttc accatgaatg atacaaccgt gtggatctct	720
	gtggctgtcc tttctgctgt catctgtttg attattgtct gggcagtggc tttgaagggc	780
	tatagcatgg tgacctgcat ctttccgcca gttcctgggc caaaaataaa aggatttgat	840
30	gctcatctgt tggagaaggg caagtctgaa gaactactga gtgccttggg atgccaagac	900
	tttcctccca cttctgacta tgaggacttg ctggtggagt atttagaagt agatgatagt	960
35	gaggaccagc atctaattgc agtccattca aaagaacacc caagtcaagg tatgaaaccc	1020
	acatacctgg atcctgacac tgactcaggc cgggggagct gtgacagccc ttcccttttg	1080
40	tctgaaaagt gtgaggaacc ccaggccaat ccctccacat tctatgatcc tgaggtcatt	1140
	gagaagccag agaatcctga aacaaccac acctgggacc cccagtgcac aagcatggaa	1200
	ggcaaaatcc cctattttca tgctggtgga tccaaatgtt caacatggcc cttaccacag	1260
45	cccagccagc acaaccccag atcctcttac cacaatatta ctgatgtgtg tgagctggct	1320
	gtgggccctg caggtgcacc ggccactctg ttgaatgaag caggtaaaga tgctttaaaa	1380
50	tcctctcaaa ccattaagtc tagagaagag ggaaaggcaa cccagcagag ggaggtagaa	1440
	agcttccatt ctgagactga ccaggatacg ccctggctgc tgccccagga gaaaaccccc	1500
	tttggctccg ctaaaccctt ggattatgtg gagattcaca aggtcaacaa agatggtgca	1560
55	ttatcattgc taccaaaaca gagagagaac agcggcaagc ccaagaagcc cgggactcct	1620
	gagaacaata aggagtatgc caaggtgtcc ggggtcatgg ataacaacat cctggtgttg	1680
60	gtgccagatc cacatgctaa aaacgtggct tgctttgaag aatcagccaa agaggcccca	1740
	ccatcacttg aacagaatca agctgagaaa gccctggcca acttactgc aacatcaagc	1800
65	aagtgcaggc tccagctggg tggtttggat tacctggatc ccgcat	1846

ES 2 444 065 T3

<210> 2
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

10	Met	Lys	Glu	Asn	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Phe	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe
	1				5					10					15	
15	Leu	Asn	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu
				20					25					30		
20	Ile	Phe	Lys	Cys	Arg	Ser	Pro	Asn	Lys	Glu	Thr	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp
			35					40					45			
25	Arg	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gly	Leu	Pro	Thr	Asn	Tyr	Ser	Leu	Thr	Tyr
		50					55					60				
30	His	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Leu	Met	His	Glu	Cys	Pro	Asp	Tyr	Ile	Thr
	65					70					75					80
35	Gly	Gly	Pro	Asn	Ser	Cys	His	Phe	Gly	Lys	Gln	Tyr	Thr	Ser	Met	Trp
					85					90					95	
40	Arg	Thr	Tyr	Ile	Met	Met	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Gln	Met	Gly	Ser	Ser
				100					105					110		
	Phe	Ser	Asp	Glu	Leu	Tyr	Val	Asp	Val	Thr	Tyr	Ile	Val	Gln	Pro	Asp
			115					120					125			

ES 2 444 065 T3

	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Lys	Gln	Pro	Glu	Asp	Arg	Lys	
	130						135					140					
5	Pro	Tyr	Leu	Trp	Ile	Lys	Trp	Ser	Pro	Pro	Thr	Leu	Ile	Asp	Leu	Lys	
	145					150					155					160	
10	Thr	Gly	Trp	Phe	Thr	Leu	Leu	Tyr	Glu	Ile	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Lys	
					165					170					175		
15	Ala	Ala	Glu	Trp	Glu	Ile	His	Phe	Ala	Gly	Gln	Gln	Thr	Glu	Phe	Lys	
				180					185					190			
20	Ile	Leu	Ser	Leu	His	Pro	Gly	Gln	Lys	Tyr	Leu	Val	Gln	Val	Arg	Cys	
			195					200					205				
25	Lys	Pro	Asp	His	Gly	Tyr	Trp	Ser	Ala	Trp	Ser	Pro	Ala	Thr	Phe	Ile	
	210						215					220					
30	Gln	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Thr	Val	Trp	Ile	Ser	
	225					230					235					240	
35	Val	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Val	Ile	Cys	Leu	Ile	Ile	Val	Trp	Ala	Val	
					245					250					255		
40	Ala	Leu	Lys	Gly	Tyr	Ser	Met	Val	Thr	Cys	Ile	Phe	Pro	Pro	Val	Pro	
				260					265					270			
45	Gly	Pro	Lys	Ile	Lys	Gly	Phe	Asp	Ala	His	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Lys	
			275					280					285				
50	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Cys	Gln	Asp	Phe	Pro	Pro	Thr	
	290						295					300					
55	Ser	Asp	Tyr	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Glu	Tyr	Leu	Glu	Val	Asp	Asp	Ser	
	305					310					315					320	
60	Glu	Asp	Gln	His	Leu	Met	Ser	Val	His	Ser	Lys	Glu	His	Pro	Ser	Gln	
					325					330					335		
65	Gly	Met	Lys	Pro	Thr	Tyr	Leu	Asp	Pro	Asp	Thr	Asp	Ser	Gly	Arg	Gly	
				340					345					350			
70	Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Cys	Glu	Glu	Pro	Gln	
			355					360					365				
75	Ala	Asn	Pro	Ser	Thr	Phe	Tyr	Asp	Pro	Glu	Val	Ile	Glu	Lys	Pro	Glu	
	370						375					380					

	Asn	Pro	Glu	Thr	Thr	His	Thr	Trp	Asp	Pro	Gln	Cys	Ile	Ser	Met	Glu	385	390	395	400
5	Gly	Lys	Ile	Pro	Tyr	Phe	His	Ala	Gly	Gly	Ser	Lys	Cys	Ser	Thr	Trp		405	410	415
10	Pro	Leu	Pro	Gln	Pro	Ser	Gln	His	Asn	Pro	Arg	Ser	Ser	Tyr	His	Asn		420	425	430
15	Ile	Thr	Asp	Val	Cys	Glu	Leu	Ala	Val	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala		435	440	445
20	Thr	Leu	Leu	Asn	Glu	Ala	Gly	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Ser	Ser	Gln	Thr		450	455	460
25	Ile	Lys	Ser	Arg	Glu	Glu	Gly	Lys	Ala	Thr	Gln	Gln	Arg	Glu	Val	Glu	465	470	475	480
30	Ser	Phe	His	Ser	Glu	Thr	Asp	Gln	Asp	Thr	Pro	Trp	Leu	Leu	Pro	Gln		485	490	495
35	Glu	Lys	Thr	Pro	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Pro	Leu	Asp	Tyr	Val	Glu	Ile		500	505	510
40	His	Lys	Val	Asn	Lys	Asp	Gly	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Lys	Gln	Arg		515	520	525
45	Glu	Asn	Ser	Gly	Lys	Pro	Lys	Lys	Pro	Gly	Thr	Pro	Glu	Asn	Asn	Lys		530	535	540
50	Glu	Tyr	Ala	Lys	Val	Ser	Gly	Val	Met	Asp	Asn	Asn	Ile	Leu	Val	Leu	545	550	555	560
55	Val	Pro	Asp	Pro	His	Ala	Lys	Asn	Val	Ala	Cys	Phe	Glu	Glu	Ser	Ala		565	570	575
60	Lys	Glu	Ala	Pro	Pro	Ser	Leu	Glu	Gln	Asn	Gln	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu		580	585	590
65	Ala	Asn	Phe	Thr	Ala	Thr	Ser	Ser	Lys	Cys	Arg	Leu	Gln	Leu	Gly	Gly		595	600	605
70	Leu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Pro	Ala	Cys	Phe	Thr	His	Ser	Phe	His			610	615	620	

<210> 3

<211> 70

	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 3		
5	gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggctac gaaggagata tacatatgaa ggaaaatgtg	60	
	gcatctgcaa	70	
10	<210> 4		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 4		
	gggaccactt tgtacaagaa agctgggttt aagctccgtg atggtgatgg tgatgtgctc	60	
20	catcattcat ggtgaagtc	79	
	<210> 5		
	<211> 48		
	<212> ADN		
25	<213> Homo sapiens		
	<400> 5		
	gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggcttc gaaggagata gaaccatg 48		
30	<210> 6		
	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 6		
	caggcttcga aggagataga accatgaagg aaaatgtggc atctgcaacc 50		
	<210> 7		
	<211> 49		
40	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 7		
45	gaaggaaaat gtggcatctg caaccgtttt cactctgcta cttttctc 49		
	<210> 8		
	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 8		
	cgttttcact ctgctacttt ttctcaacac ctgccttctg aatggaggag 50		
	<210> 9		
55	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 9		
60	caacacctgc cttctgaatg gaggagcaca tcaccatcac catcacggag 50		
	<210> 10		
	<211> 50		
	<212> ADN		
65	<213> Homo sapiens		

<400> 10
 cacatcacca tcacatcac ggagctcagt tacctcctgg aaacctgag 50

 <210> 11
 5 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 10 gggaccactt tgtacaagaa agctgggttc actgaactat gtaagtcacg tccac 55

 <210> 12
 <211> 48
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 gggacaagtt tgtacaaaaa agcaggcttc gaaggagata gaacatg 48

 20 <210> 13
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 13
 caggcttcga aggagataga accatgaagg aaaatgtggc atctgcaacc 50

 <210> 14
 <211> 49
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 gaaggaaaat gtggcatctg caaccgttt cactctgcta cttttctc 49
 35
 <210> 15
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 15
 cgtttcact ctgctacttt ttctaacac ctgcctctg aatgttca 48

 <210> 16
 45 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 50 tctcaacacc tgcctctga atgttcagcc agaccctcct ttggagctg 49

 <210> 17
 <211> 49
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

 <400> 17
 cgtgatggg atggtgatgt gctccatcat tcatggtgaa gtcactagg 9

 60 <210> 18
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 65 <400> 18
 caagaaagct gggtttaagc tccgtgatgg tgatgggatg gtgctcc 47

<210> 19
 <211> 37
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 19
 gggaccactt tgtacaagaa agctggggtt aagctcc 37

 10 <210> 20
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

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

 20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

 30 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

 45 Ala Thr Pro Val Val Val Ala Pro Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

 50 Val Thr Val
 115

 <210> 21
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 21

1 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 5 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 10 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 15 Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 20 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 25 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 30 Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 <210> 22
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 45 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 50 Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 60 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 65 Ala Arg Ala Ser Ser Thr Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 Thr Val

<210> 23
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (84)..(84)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10
 <400> 23

 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 20
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 25
 Ile Tyr Asp Asn Tyr Arg Arg Pro Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 30
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 35
 Ser Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Gly Arg Leu
 85 90 95
 40
 Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 45
 <210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

ES 2 444 065 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Val Val Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Thr Thr Tyr Val Pro Tyr Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 35 Val
 <210> 25
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 40 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 45 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 50 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 55 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 60 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 26
5 <211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30

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

25 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

35 Ala Arg Asp Asn Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ala
100 105 110

40 Thr Val

<210> 27
45 <211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

50 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

55 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

60 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

ES 2 444 065 T3

Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

5 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

10 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ala Trp Asp Asp Thr Leu
85 90 95

15 Asn Gly Pro His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 28
<211> 116
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 28

25 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

35 Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

50 Ala Arg Ala Asp Ser Ser Gly Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

55 Leu Val Thr Val
115

<210> 29
<211> 110
<212> PRT
60 <213> Homo sapiens

<400> 29

ES 2 444 065 T3

	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
5	1				5					10					15	
	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn
				20					25					30		
10	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
			35					40					45			
15	Ile	Tyr	Asp	Asn	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50						55					60				
20	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg
	65					70					75					80
25	Ser	Lys	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu
					85					90					95	
30	Asn	Gly	Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu		
				100					105					110		
	<210> 30															
	<211> 119															
	<212> PRT															
35	<213> Homo sapiens															
	<400> 30															

ES 2 444 065 T3

[illegible]

ES 2 444 065 T3

	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	
				20					25					30			
10	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Gly	Asn	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50						55					60					
20	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	
	65					70					75					80	
25	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gly	Trp	Asp	Gly	Arg	Leu	
				85						90					95		
30	Ile	Gly	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu			
				100					105					110			
35	<210> 32																
	<211> 116																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
40	<400> 32																
	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
45	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
				20					25					30			
50	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
55	Ser	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50						55					60					
60	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	

ES 2 444 065 T3

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

5 Ala Thr Gly Ile Ala Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

10 Leu Val Thr Val
 115

15 <210> 33
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 33

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

25 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

30 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

35 Ile Tyr Asp Ser Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

40 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asn Ser Leu
 85 90 95

45 Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

50 <210> 34
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 34

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

60 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

5 Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Tyr Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

20 Thr Thr Gly Ala Ser Tyr His Ala Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val

25 <210> 35
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 35

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

35 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

40 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

45 Ile Tyr Asp Asp Ile Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

50 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

55 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

60 Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 444 065 T3

<400> 36

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

<210> 37

<211> 109

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

ES 2 444 065 T3

Lys Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 38
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

20 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

25 Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Glu Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

35 Ala Lys Gly Gly Tyr Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

40 Val Thr Val
115

<210> 39
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

50

ES 2 444 065 T3

	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Asn	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	
				20					25					30			
10	Tyr	Val	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
		50					55					60					
20	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	
	65					70					75					80	
25	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	
					85					90					95		
30	Ser	Gly	Arg	Val	Phe	Gly	Gly	Arg	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu			
				100					105					110			
	<210> 40																
	<211> 118																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
35	<400> 40																

ES 2 444 065 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
 20 25 30
 10 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Ser Ser Ile Ser Ala Ala Ala Thr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 35 Gly Thr Leu Val Thr Val
 115
 40 <210> 41
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

ES 2 444 065 T3

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

5 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Val Pro Lys Leu Leu
35 40 45

10 Ile Tyr Glu Asn Lys Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

15 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

20 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

25 Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 42

35 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

40 Phe Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

50 Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Arg Arg Ala Ile Ala Val Ala Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115

ES 2 444 065 T3

<210> 43
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

ES 2 444 065 T3

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

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

10 Gly Thr Leu Val Thr Val
 115

<210> 45
 <211> 110
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45

20 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

25 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

30 Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

35 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

40 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

45 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

50 Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 46
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46

55 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

60 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Gly
 20 25 30

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

5 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

20 Ala Arg Gly Ala Glu Ile Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val
<210> 47
25 <211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

35 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

40 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

45 Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

50 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

55 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

60 <210> 48
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

65 <400> 48

	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ser	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50						55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Thr	Arg	Gly	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val		
				100					105					110			
35	<210>	49															
	<211>	108															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
35	<400>	49															

ES 2 444 065 T3

	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	
				20					25					30			
10	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50						55					60					
20	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	
	65					70					75					80	
25	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Met	Ile	Trp	Pro	Ser	Asn	Ala	
					85					90					95		
30	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Arg	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu					
						100				105							
35	<210> 50 <211> 114 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 50																

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ser Ser
 20 25 30
 10 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 20 Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Gly Ala Pro Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 30 Thr Val
 <210> 51
 <211> 110
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 40 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 45 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Thr Ser Ser Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 50 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 55 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

ES 2 444 065 T3

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

5 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

10 Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 52
 <211> 118
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

20 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

30 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

35 Ser Gly Val Gly Ser Ser Gly Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

50 Ala Arg Val Gly Ala Thr Ser Ser Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

55 Gly Thr Leu Val Thr Val
 115

<210> 53
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

60 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Phe Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 5 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 10 Ile Tyr Arg Asn Glu Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 15 Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 20 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 25 <210> 54
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (103)..(103)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 35 <400> 54

[illegible]

ES 2 444 065 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Ser
20 25 30

His Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asn Asp Asn Leu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ile Gly Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Lys Val Leu
100 105 110

<210> 56

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

25 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 444 065 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10 Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

15 Leu Val Thr Val
 115

<210> 57
 <211> 110
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 57

25 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

30 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

35 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

40 Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

45 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

50 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Gly Ser Leu
 85 90 95

55 Ser Gly Trp Ala Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 58
 <211> 112
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 58

60 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

10 Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

25 Ala Arg Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

<210> 59
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 59

35 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

40 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

45 Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

50 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

55 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser Leu
85 90 95

60 Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 60
<211> 111
<212> PRT

ES 2 444 065 T3

<213> Homo sapiens

<400> 60

```

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
    20           25           30

15 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35           40           45

20 Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
    50           55           60

25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65           70           75           80

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

35 Thr Thr Val Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    100          105          110

```

<210> 61

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

```

40 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
   1           5           10           15

45 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
    20           25           30

50 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
    35           40           45

55 Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
    50           55           60

60 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
    65           70           75           80

   Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85           90           95

```

Leu Ser Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

5 <210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 62

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

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

25 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

40 Ala Arg Gly Gly Gly Gln Gln Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
115

45 <210> 63
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <400> 63

ES 2 444 065 T3

	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	
				20					25					30			
10	Phe	Val	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Gly	Asn	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
		50					55					60					
20	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	
	65					70					75					80	
25	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly	Ser	Leu	
					85					90					95		
30	Ser	Gly	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu			
				100					105					110			
	<210> 64																
	<211> 117																
	<212> PRT																
35	<213> Homo sapiens																
	<400> 64																

ES 2 444 065 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Thr	Ala	Phe	Thr	Gly	Pro	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
35	Thr	Leu	Val	Thr	Val												
				115													
40	<210>	65															
	<211>	110															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	65															
	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		

ES 2 444 065 T3

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

5 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

10 Ile Tyr Thr Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

15 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

20 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

25 Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

30 <210> 66
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66

35 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr
 20 25 30

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

50 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Ala Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Pro Val
 50 55 60

55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

65 Ala Arg Gly Thr Tyr Gly Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val
 115

<210> 67
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 15
 <400> 67

 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Xaa Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 20 1 5 10 15

 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 25 20 25 30

 Tyr Val Ser Trp Tyr Xaa Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 30 35 40 45

 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 35
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 40
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 45
 Ser Gly Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 68
 <211> 112
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 55
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 60
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
5	Ser	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
10	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
15	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
20	Ile	Gly	Ser	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
				100					105					110			
	<210> 69																
	<211> 110																
	<212> PRT																
25	<213> Homo sapiens																
	<220>																
	<221> misc_feature																
	<222> (72)..(72)																
30	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural																
	<220>																
	<221> misc_feature																
	<222> (82)..(82)																
35	<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural																
	<400> 69																

ES 2 444 065 T3

```

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1      5              10          15

5   Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
     20                      25            30

10  Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
     35                     40           45

15  Ile Tyr Asp Asn Asp Arg Arg Pro Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
     50                  55             60

20  Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Xaa Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
     65                 70         75           80

25  Ser Xaa Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
     85                90        95

    Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

               100       105       110

<210> 70
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35  <400> 70
```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Ser Trp Leu Gln Val Asp Ala Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 30 Leu Val Thr Val
 115
 35 <210> 71
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 71
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 45 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 50 Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 55 Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

5 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

10 Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 72
 <211> 112
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 72

20 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

30 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35

35 Ala Leu Ile Ser Phe Asp Gly Ser Lys Thr Asn Tyr Gly Gly Pro Val
 50 55 60

40 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

50 Thr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

<210> 73
 <211> 109
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 73

55 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

60 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

5 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

10 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

15 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

20 Lys Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

25 <210> 74
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

45 Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Arg Thr Ser Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

60 Ala Arg Gly Leu Ile Gly Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

65 Val Ser Ser
 115

70 <210> 75
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

75 <400> 75

[illegible]

	atggactcca ggctcaattt agttttcctt gtccttattt taaaagggtgt ccagtgtgac	60
	gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcagcctg gaggggtccc gaaactctcc	120
5	tgtgcagcct ctggattcgc tttcagtagt tttggaatgc agtgggttcg tcagggtcca	180
	gagaaggggc tggagtgggt cgcataatatt agtagtggca gtagtaccat ctactatgca	240
10	gacacagtga agggccgatt caccatctcc agagacaatc ccaagaacac cctgttcctg	300
	caaatgacca gtctaaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgtaag atctgggagg	360
15	gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtcagctca	399
	<210> 78	
	<211> 387	
	<212> ADN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 78	
	atgagggttcc aggttcaggt tctggggctc cttctgctct ggatatcagg tgcccagtg	60
25	gatgtccaga taaccagtc tccatcttat cttgctgcat ctctggaga aaccattact	120
	cttaattgca gggcaagtaa gaacatttac aaatatttag cctggatatca agaaaaacct	180
30	gggaaaacta ataaccttct tatctactct ggatccactt tgcattctgg aattccatca	240
	aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat ttcactctca ccatcagtag cctggatcct	300
35	gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgatt acccgtagac gtctcgagg	360
	gggaccaagc tggagataaa acgggct	387
	<210> 79	
40	<211> 405	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 79	
45	atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctggtatcct gtctgatgtg	60
	cagcttcagg agtcgggacc tggcctgggtg aagccttctc agtctctgtc cctcacctgc	120
50	actgtcactg gctactcaat caccagtgat tatgcctgga actggatccg gcagtttcca	180
	ggaaacaaac tggagtggat gggctacata agttacagtg gtagtactag ctacaacca	240
55	tctctcaaaa gtcgaatctc tatcactcga gacacatcca agaaccagtt cttcctgcag	300
	ttgaattctg tgactactga ggacacagcc acatattttt gtgcaagaga ctacggctac	360
60	gtctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca	405
	<210> 80	
	<211> 399	
	<212> ADN	
65	<213> Homo sapiens	

<400> 80

	atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
5	gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gggggccacc	120
	atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atacttatat gcactggtac	180
10	caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct	240
	gggggtccctg ccagggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	300
15	cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtgggga gcttcctccc	360
	tcgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggct	399

<210> 81

<211> 429

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 81

25	atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gccctcattt taaaagggtg ccagtgtgag	60
	gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gaggggtccct gaaactctcc	120
30	tgtgcagtct ctggattcac ttccagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca	180
	gacaagaggc tggagtgggt cgcaaccgtt agtagtgggt gtacttacac ctactatcca	240
35	gacagtgtga aggggagatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
	caaatgagca gtctgaagtc tgaggactca gccatgtatt actgtgcaag acatagggga	360
	aactactatg ctacttatta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc	420
40	gtctcctcg	429

<210> 82

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

ES 2 444 065 T3

	Ser	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Gly	Val	Ser	Asn	Asp	
				20					25					30			
10	Val	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
		35						40					45				
15	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Leu	Thr	Gly	
	50						55					60					
20	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Asn	Thr	Val	Gln	Ala	
	65					70					75					80	
25	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Thr	Ser	Pro	Thr	
					85					90					95		
			Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala			
						100					105						
30	<210> 83																
	<211> 114																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
	<400> 83																

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 10 Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Val Arg Ser Gly Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 100 105 110
 30 Ser Ser
 <210> 84
 <211> 109
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 40 Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 45 Glu Thr Ile Thr Leu Asn Cys Arg Ala Ser Lys Asn Ile Tyr Lys Tyr
 20 25 30
 50 Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu His Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Pro
 65 70 75 80

10 Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95

15 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105

<210> 85
 <211> 117
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 85

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

30 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

35 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

40 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

45 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

50 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

60 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 86
 <211> 113
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens
 <400> 86

ES 2 444 065 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 5 Gln Gly Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 10 Gly Tyr Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 15 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 20 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 25 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
 85 90 95
 30 Glu Leu Pro Pro Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 35 Ala
 <210> 87
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 87
 40 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 45 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 50 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 55 Ala Thr Val Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 444 065 T3

Ala Arg His Arg Gly Asn Tyr Tyr Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

5 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 88
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 88
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

20 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

25 Gly Tyr Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

30 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

35 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

40 Pro Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
85 90 95

45 Glu Leu Pro Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

50 <210> 89
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75				80		
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Arg	His	Arg	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	
				100					105					110			
35	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			115					120									
40	<210>	90															
	<211>	124															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
40	<400>	90															

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
	50					55						60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70				75						80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Arg	His	Arg	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	
				100					105					110			
35	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			115					120									
	<210> 91																
	<211> 107																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
	<400> 91																

	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Asp	Arg	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Asn	Ile	Tyr	Lys	Tyr	
				20					25					30			
10	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Asn	Asn	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
15	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	His	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75					80	
25	Glu	Asp	Phe	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asn	Asp	Tyr	Pro	Tyr	
					85					90					95		
30	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
				100					105								
35	<210>	92															
	<211>	107															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
40	<400>	92															
	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
45	Asp	Arg	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Asn	Ile	Tyr	Lys	Tyr	
				20					25					30			
50	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
55	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	His	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
60	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asn	Asp	Tyr	Pro	Tyr	
					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
				100					105								

<210> 93
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 94
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

ES 2 444 065 T3

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

5 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

15 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 95
 <211> 106
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 95

25 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

30 Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp
 20 25 30

35 Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Leu Ser Gly
 50 55 60

40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

45 Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Thr
 85 90 95

50 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 96
 <211> 106
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 96

60 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 5 Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 10 Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Leu Ser Gly
 50 55 60
 15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 20 Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Thr
 85 90 95
 25 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 97
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 97
 35 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 40 Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 45 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 55 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60 Val Arg Ser Gly Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 98
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que tiene una constante de disociación en equilibrio de 10^{-6} M o inferior con respecto a PRLR y que comprende 6 CDR, en el que:

- 5 (a) (i) CDRL1 tiene la secuencia RASKSVSTSGYTYMH;
 (ii) CDRL2 tiene la secuencia LASNLES;
 (iii) CDRL3 tiene la secuencia QHSGELPPS;
 (iv) CDRH1 tiene la secuencia SYGMS;
 (v) CDRH2 tiene la secuencia ATVSSGGTYTYYPDSVKG; y
 10 (vi) CDRH3 tiene la secuencia HRGNYYATYYYAMDY; o
- (b) (i) CDRL1 tiene la secuencia KASKSVSTSGYTYMH;
 (ii) CDRL2 tiene la secuencia LASNRES;
 (iii) CDRL3 tiene la secuencia QHSGELPPS;
 15 (iv) CDRH1 tiene la secuencia SYGMS;
 (v) CDRH2 tiene la secuencia TVSSGGTYTYYPDSVKG; y
 (vi) CDRH3 tiene la secuencia HRGNYYATYYYAMDY.

20 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo manipulado humano, un anticuerpo humano, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de anticuerpo.

3. El anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: i) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 86 y 25 88; ii) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 87, 89 y 90; iii) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable SEC ID N°: 88 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 89; iv) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable SEC ID N°: 88 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 90 y v) una 30 secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable SEC ID N°: 86 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 87.

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la región constante de la cadena pesada es una IgG, IgM, IgA, IgD, IgE modificada o sin modificar, un fragmento de las mismas, o combinaciones de 35 las mismas.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que la región constante de la cadena pesada es una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificada o sin modificar.

40 6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una constante de disociación en equilibrio de 10^{-7} , 10^{-8} ó 10^{-9} M o inferior con respecto a PRLR.

7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la región constante de la cadena ligera es una región constante de la cadena ligera lambda modificada o sin modificar, una región constante de la cadena 45 ligera kappa, un fragmento de las mismas, o combinaciones de las mismas.

8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que inhibe una actividad seleccionada del grupo que consiste en i) dimerización de PRLR; ii) fosforilación intracelular de PRLR; iii) inducción de la fosforilación de MAPK; iv) inducción de la fosforilación de Sta 5; v) inducción de la fosforilación de AKT; vi) unión de PRL a PRLR; 50 vii) producción y/o angiogénesis de VEGF; y viii) proliferación de un cáncer de células de mama, próstata o pulmón.

9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que está conjugado con otro agente de diagnóstico o terapéutico.

10. Un procedimiento de selección de un anticuerpo para el dominio extracelular de una proteína de PRLR útil para 55 el tratamiento de cáncer que comprende las etapas de:

poner en contacto un polipéptido que comprende el DEC de PRLR con un anticuerpo candidato que contiene las 6 CDR del anticuerpo de la reivindicación 1;

detectar la afinidad de unión del anticuerpo candidato por el polipéptido, e

60 identificar dicho anticuerpo candidato como un anticuerpo útil para el tratamiento de cáncer si se detecta una constante de disociación en equilibrio de 10^{-6} M o inferior.

11. Un procedimiento de alteración sistemática de anticuerpos y de selección de un anticuerpo para el dominio extracelular de una proteína de PRLR útil para el tratamiento de cáncer que comprende las etapas de:

preparar un anticuerpo candidato que contiene modificaciones a uno o dos aminoácidos dentro de las CDR del anticuerpo de la reivindicación 1,
 poner en contacto un polipéptido que comprende el DEC de PRLR con dicho anticuerpo candidato,
 detectar la afinidad de unión del anticuerpo candidato por el polipéptido, e
 5 identificar dicho anticuerpo candidato como un anticuerpo útil para el tratamiento de cáncer si se detecta una constante de disociación en equilibrio de 10^{-6} M o inferior.

12. Un procedimiento de selección de un anticuerpo para el dominio extracelular de una proteína de PRLR útil para el tratamiento de cáncer que comprende las etapas de:

10 poner en contacto una célula de mama, pulmón o próstata con un anticuerpo candidato que contiene las 6 CDR del anticuerpo de la reivindicación 1 o un anticuerpo que contiene una modificación de uno o dos aminoácidos dentro de una o más CDR;

15 detectar proliferación o supervivencia de dicha célula; e
 identificar dicho anticuerpo candidato como un anticuerpo útil para el tratamiento de cáncer si se detecta una disminución en la proliferación o supervivencia celular.

13. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un procedimiento para tratar un sujeto que padece cáncer.

14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para tratar según la reivindicación 13, en el que el cáncer es cáncer de mama, pulmón o de próstata.

15. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para tratar según la reivindicación 14, en el que se administra un segundo agente terapéutico.

16. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para tratar según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo comprende:

- 30 (a) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de SEC ID N°: 86 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 87;
- (b) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de SEC ID N°: 88 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 89; o
- 35 (c) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de SEC ID N°: 88 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de SEC ID N°: 90.

17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para tratar según la reivindicación 14, en el que el sujeto es positivo para expresión de PRLR y: i) expresión de HER2-neu, y en el que dicho segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-Her2-neu; o ii) expresión de ER, y en el que dicho segundo agente terapéutico es un anticuerpo anti-ER.

18. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para tratar según la reivindicación 14, en el que el sujeto se trata adicionalmente con radioterapia o cirugía.

19. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento de elección como diana de una célula tumoral que expresa PRLR, en el que dicho anticuerpo está conjugado con un radionúclido u otra toxina.

20. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento para tratar según las reivindicaciones 14-18, o el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento de elección como diana de una célula tumoral que expresa PRLR según la reivindicación 19, en el que el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

21. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

22. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 21 operativamente ligada a una secuencia de control reguladora.

23. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 22 o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 21.

24. Un procedimiento de uso de la célula huésped de la reivindicación 23 para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 23 bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo.

25. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que se purifica a al menos el 95 % de homogeneidad en peso.

5 26. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 25 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 27. Un kit que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, envasada en un recipiente, conteniendo dicho kit opcionalmente un segundo agente terapéutico, y que comprende además una etiqueta unida a o envasada con el recipiente, describiendo la etiqueta el contenido del recipiente y proporcionando indicaciones y/o instrucciones referentes al uso del contenido del recipiente para tratar cáncer, por ejemplo, en el que el recipiente es un vial o botella o jeringuilla precargada.

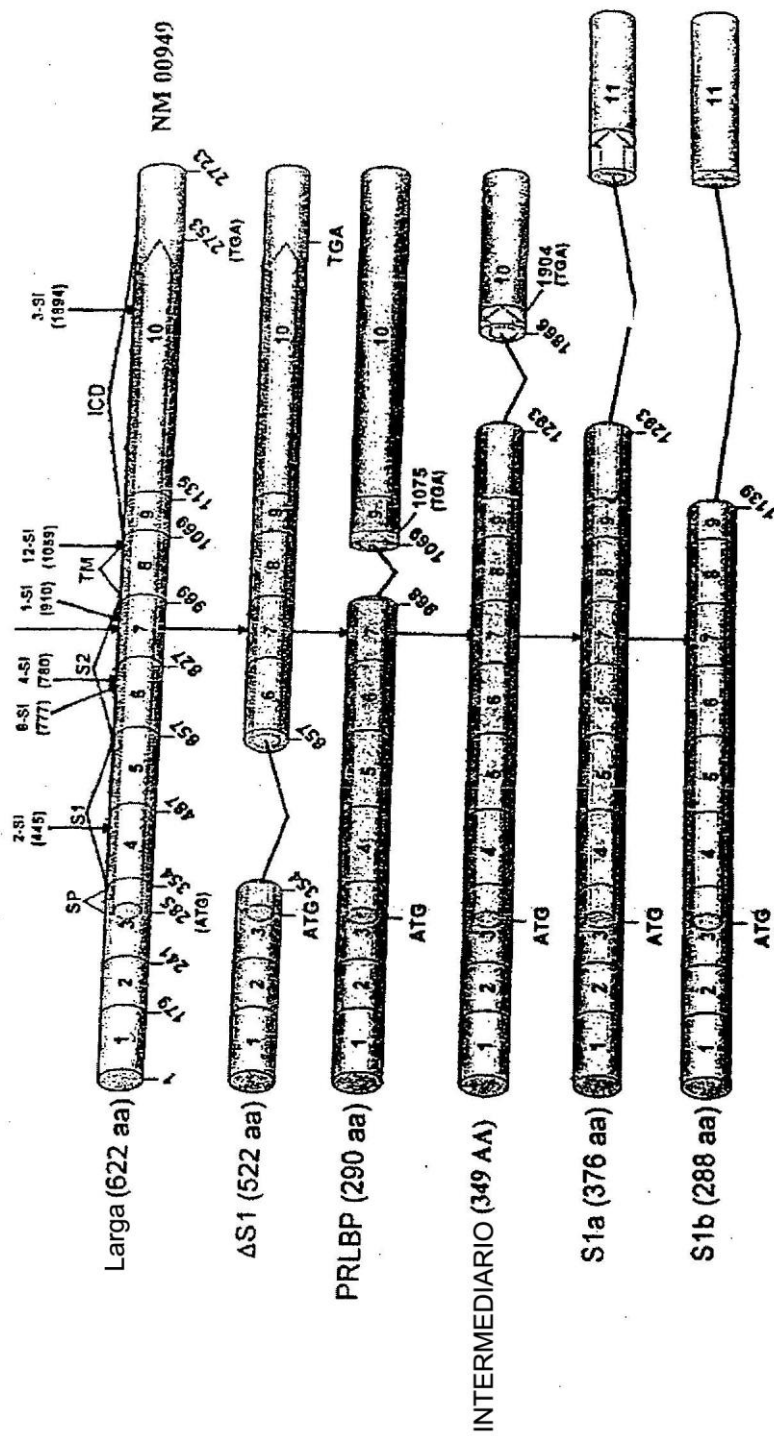


Figura1

Figura 2: Los anticuerpos específicos de PRLR inhiben la fosforilación de pERK 1/2

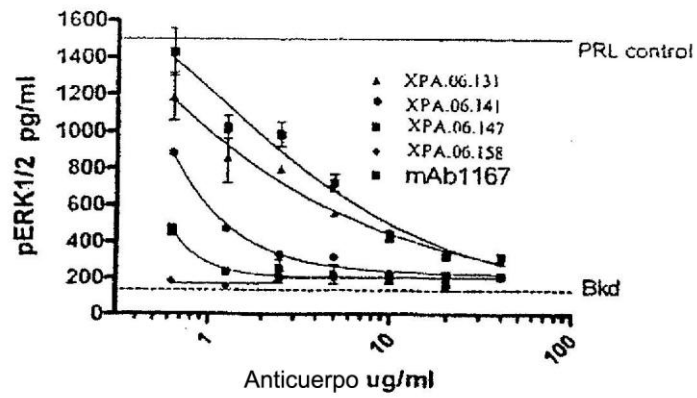


Figura 3: Anticuerpos específicos de PRLR inhiben la fosforilación de pERK 1/2

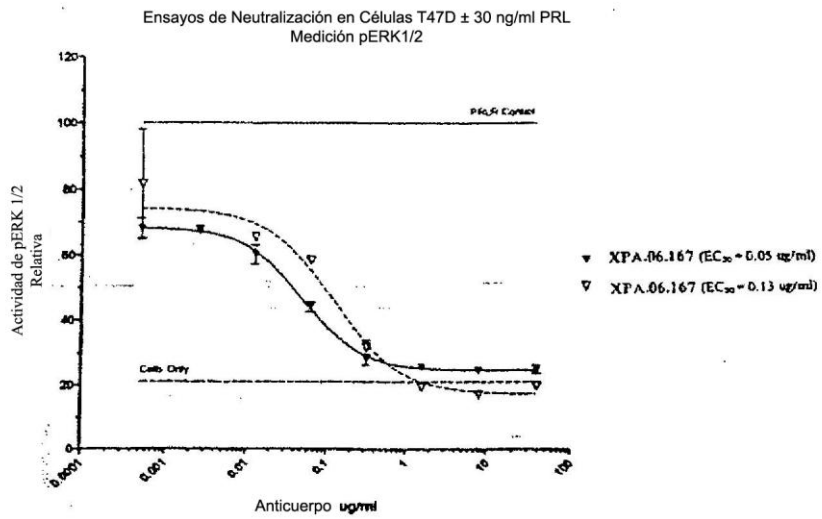


Figura 4: Los anticuerpos específicos de PRLR inhiben la fosforilación de pERK 1/2

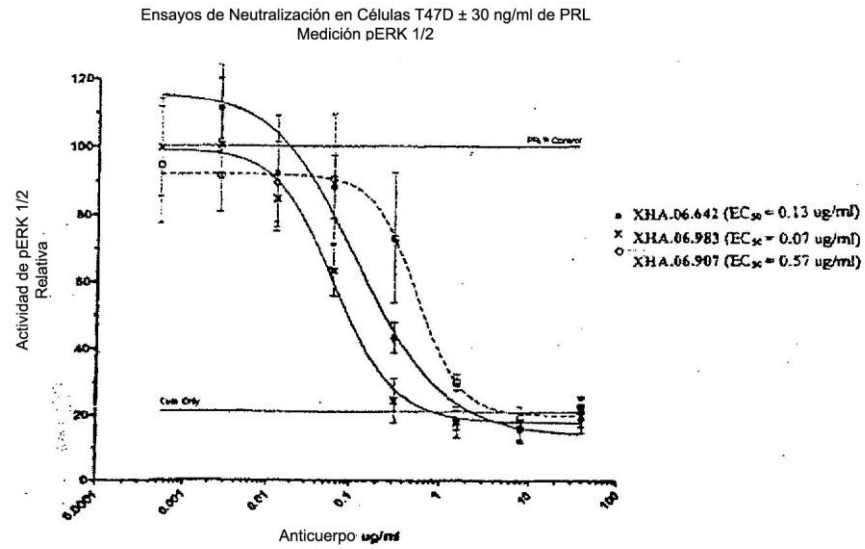
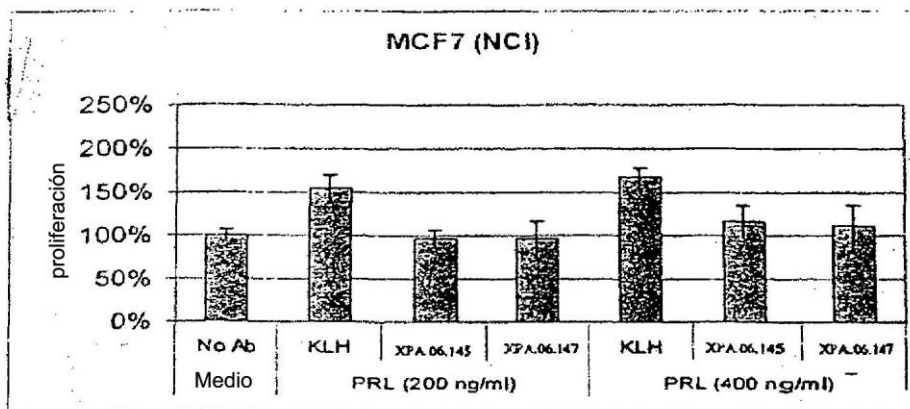


Figura 5: scFv a 5 ug/ml inhibe la proliferación de la línea celular tumoral



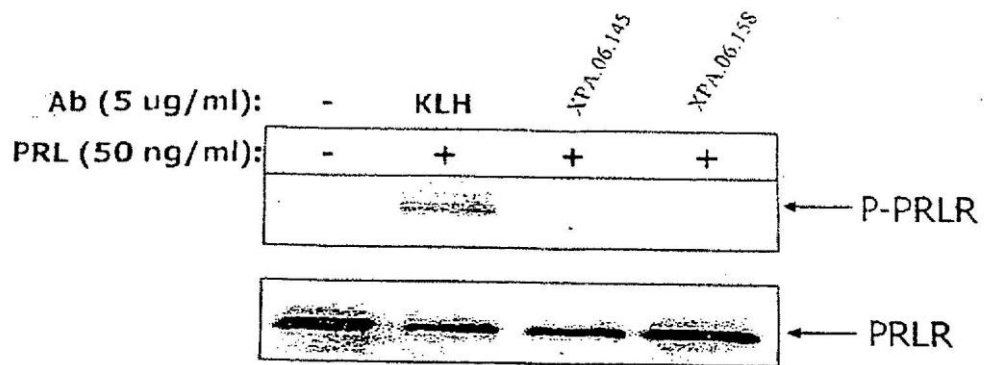


Figura 6; Los anticuerpos específicos de PRLR inhiben la fosforilación del receptor inducida por PRL

FIGURA 7A

SEQ ID NO: 20
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATPVVYAPGYWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 21
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDSSLSGPFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 22
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSYTYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASTSDYWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 23
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDADYYCAVWDGRLNGPFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 24
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGVVAYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTYVPYSRWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 25
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDSSLSGPFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 26
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYPVHWVRQAPGKGLEWVAISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNPPFDYWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 27
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCEAWDDTLNQPHVVFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 28
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNMGHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADSSGTVDYWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 29
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDSSLSGPFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 30
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIGGRGVSTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSNWTHALGFDPWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 31
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAGWDGRLIGWVFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 32
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGLAVAGFDYWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 33
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAAWDNSLNGWVFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 34
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGRTHYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTGASYHALWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 35
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDDIKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCATWDDSLNGPFVGGGKLTVL

SEQ ID NO: 36
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVALISFDGSKTNYGGPVQGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGAFDIWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 37
 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDSSLSKPVFVGGGKLTVL

FIGURA 7B

SEQ ID NO: 38
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMWVRQAPGKGLEWVAFISYDGNKESYADSVKGRFTISRDN
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGYGLFDYWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 39
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGNSNIGSNYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAA~~WDDSLSGVVF~~GGGKLTVL

SEQ ID NO: 40
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMH WVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSISAAATGLDYWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 41
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTSNIGSNTVNWYQQLPGTVPKLLIYENKKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAA~~WDDSLSGWVF~~GGGKLTVL

SEQ ID NO: 42
 EVQLLESGGGLVQPGGFLRLSCAASGFTFSYSMNWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATBRAIAVAGAFDIWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 43
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSAENIGINGVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAA~~WDDSLSGQVF~~GGGKLTVL

SEQ ID NO: 44
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMWVRQVPKGKLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPSGAYPTFFDNWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 45
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTSNIGSNYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAA~~WDDSLSGWVF~~GGGKLTVL

SEQ ID NO: 46
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSGPMSWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAEI~~FDI~~WGQGLTVTV

SEQ ID NO: 47
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCA~~SWDDSLSGVVF~~GGGKLTVL

SEQ ID NO: 48
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR~~GDF~~WGQGLTVTV

SEQ ID NO: 49
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCMIWPSNAWVF~~GGRT~~KLTVL

SEQ ID NO: 50
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSSPMHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYVDSVKRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA~~PAFDI~~WGQGLTVTV

SEQ ID NO: 51
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTSSIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAA~~WDDSLNGVVF~~GGGKLTVL

SEQ ID NO: 52
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGYGSSGVNTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYGATSS~~THFDY~~WGQGLTVTV

SEQ ID NO: 53
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRFNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNENRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGL
 RSEDEADYYCAA~~WDGSLSAWVF~~GGGKLTVL

SEQ ID NO: 54
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMH WVRQAPGKGLEWVA~~AI~~SYEGSTK~~FY~~ADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGVYYXGMDVWGQGLTVTV

SEQ ID NO: 55
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTSNIGSNHVVYQQLPGTAPKLLIYDNNLRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCQSYD~~SSLIGWMF~~GGGKLTVL

FIGURA 7C

SEQ ID NO: 56
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSMNWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNRAGAFDIWGQGLVTV

SEQ ID NO: 57
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYKNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAWDDSLSGWAFGGGRTKLTVL

SEQ ID NO: 58
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWEDPWGQGLVTV

SEQ ID NO: 59
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 60
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKLEWVSGVSWNGSRTHYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTVSLYWGQGLVTV

SEQ ID NO: 61
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLRSEDEADYYCQSYDSSLRWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 62
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGQQLGAFDIWGQGLVTV

SEQ ID NO: 63
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNEVTWYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 64
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATAFGPDADFIDWGQGLVTV

SEQ ID NO: 65
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNAVNWYQQLPGTAPKLLIYTNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 66
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYPMTWVRQAPGKLEWVAVISYDASQTYAEPVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTYGLLDYWGQGLVTV

SEQ ID NO: 67
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGNNYVSWYXQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLSGVFGGGRTKLTVL

SEQ ID NO: 68
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIGSWEDPWGQGLVTV

SEQ ID NO: 69
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPLGVDRFSGSKSGTSXSLAISG
 LRSDDEADYYCAAWDDSLSGVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 70
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDNYGMSWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASWLQVDAFDLWGQGLVTV

SEQ ID NO: 71
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCATWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 72
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVALISFDGSKTNYGGPVQGRFTISRDN
 ENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGAFDIWGQGLVTV

SEQ ID NO: 73
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLKPVFGGGTKLTVL

FIGURE 8

SEQ ID NO: 74

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGRTSYTDSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLIGDNWGQGT LVTSS

SEQ ID NO: 75

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHJWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

FIGURA 10

XHA.06.983 VL (SEQ ID NO: 82)

SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQGVSNDAWFQKPGQSPKLLIYSASTRYTG
VPDRLTGSGYGTDFITINTVQAEDLAVYFCQQDYTSPTFGGGTKLEIKRA

XHA.06.983 VH (SEQ ID NO: 83)

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFAFSFGMQWVRQAPEKGLEWVAYISSGSS
TIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCVRSGRDYWGQGTSTVTV
SS

XHA.06.275 VL (SEQ ID NO: 84)

DVQITQSPSYLAASPGETITLNCRAASKNIKYLAWYQEKPGKTNNLLIYSGSTLHSGIP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLDPEDFAMYYCQQHNDYPYTFGGGKLEIKRA

XHA.06.275 VH (SEQ ID NO: 85)

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKLEWMGYISYSGS
TSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYFCARDYGYVFDYWGQGTTLTV
SS

XHA.06.642 VL (SEQ ID NO: 86)

DIVLTQSPASLAVSLGQGATISCRASKSVSTSGYTYMHWYQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSSELPPSFGGGKLEIKRA

XHA.06.642 VH (SEQ ID NO: 87)

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATVSSGGT
YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDSAMYYCARHRGNYYATYYAM
DYWGQGTSTVTVSS

Figura 11

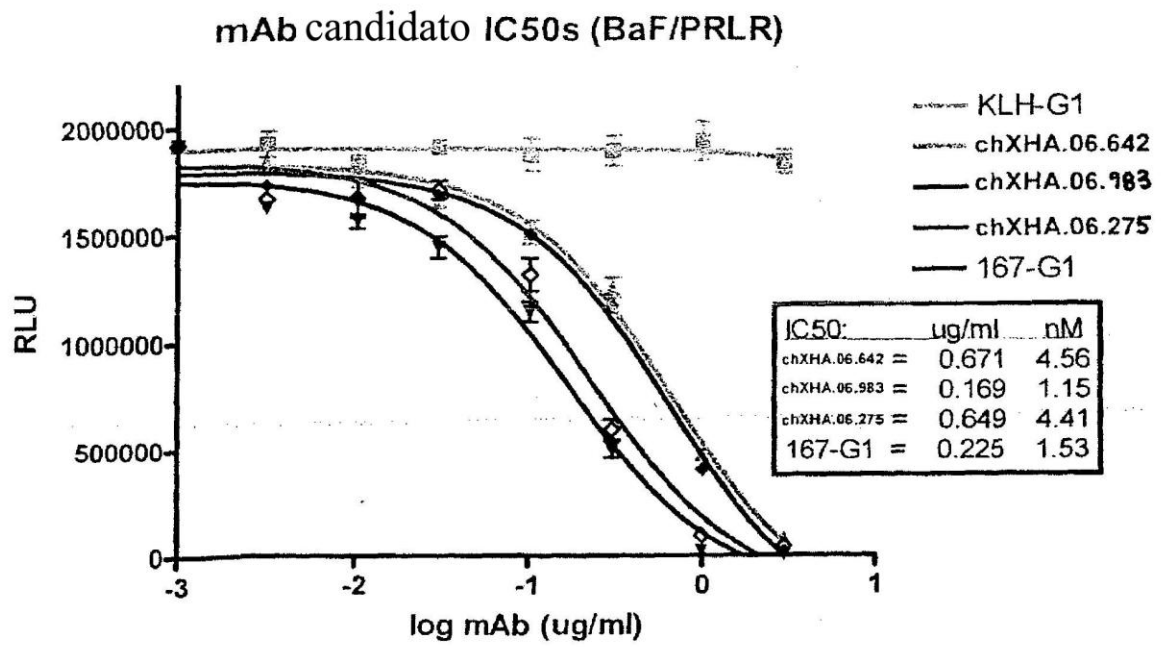


Figura 12

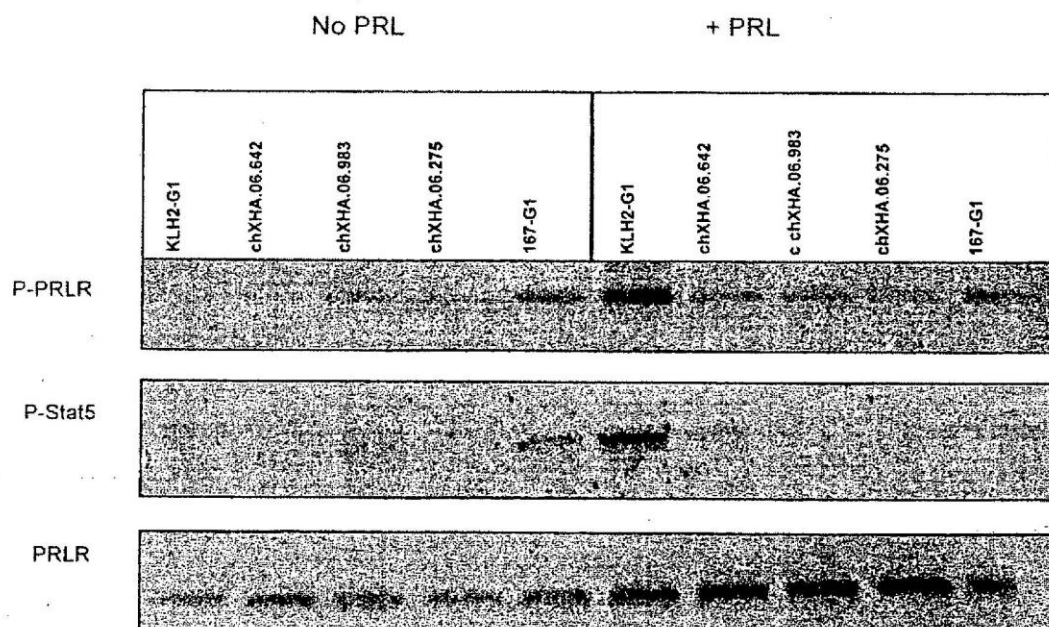


Figura 13

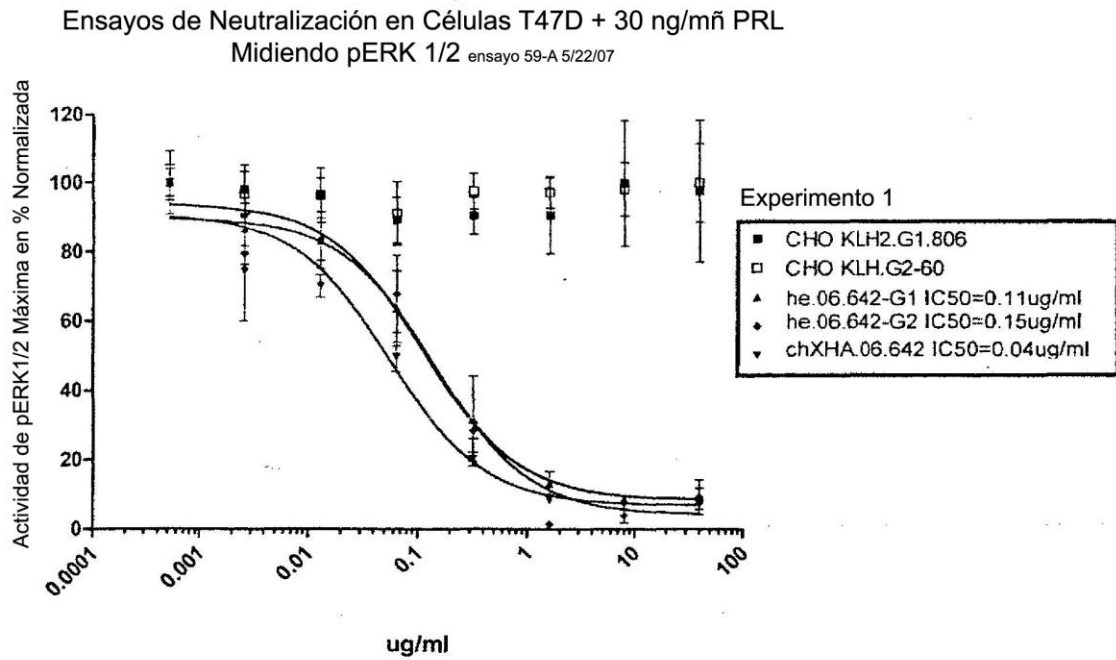


Figura 14

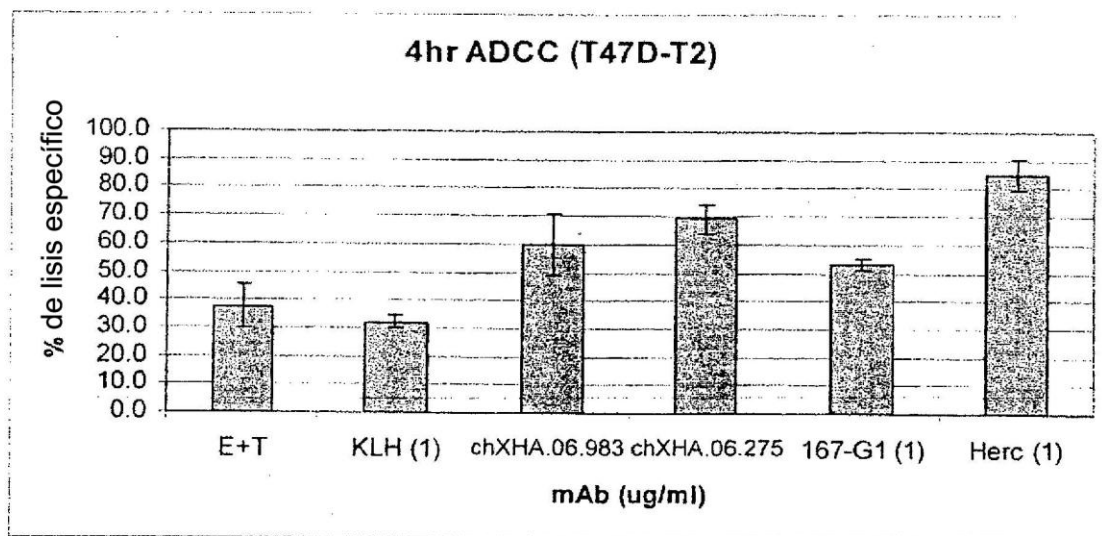


Figura 15

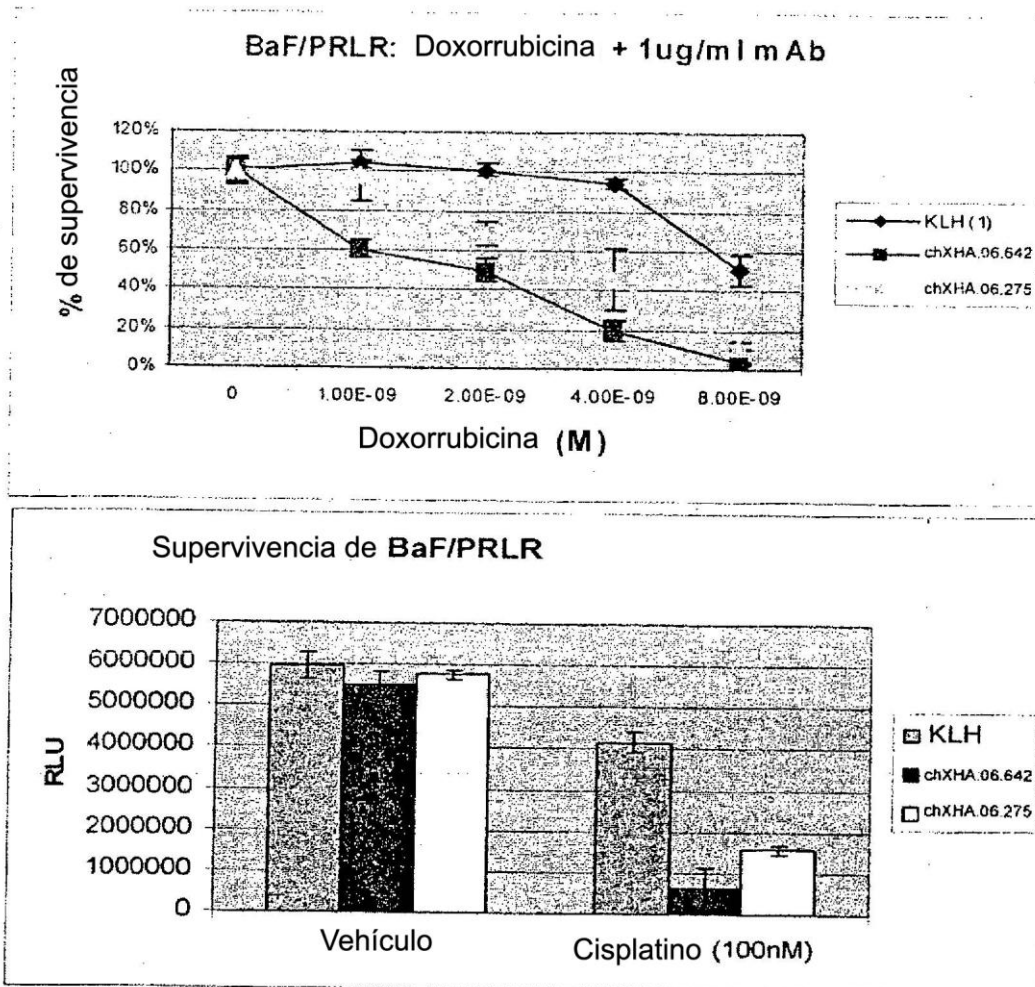


Figura 16

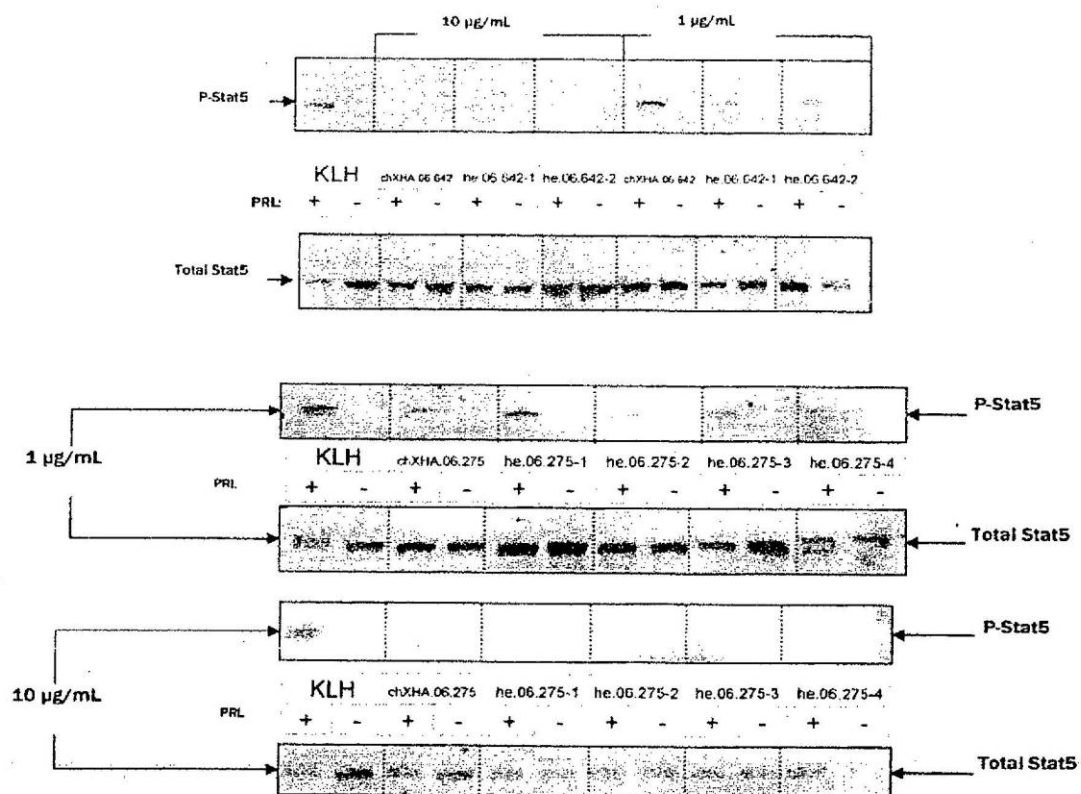


Figura 17

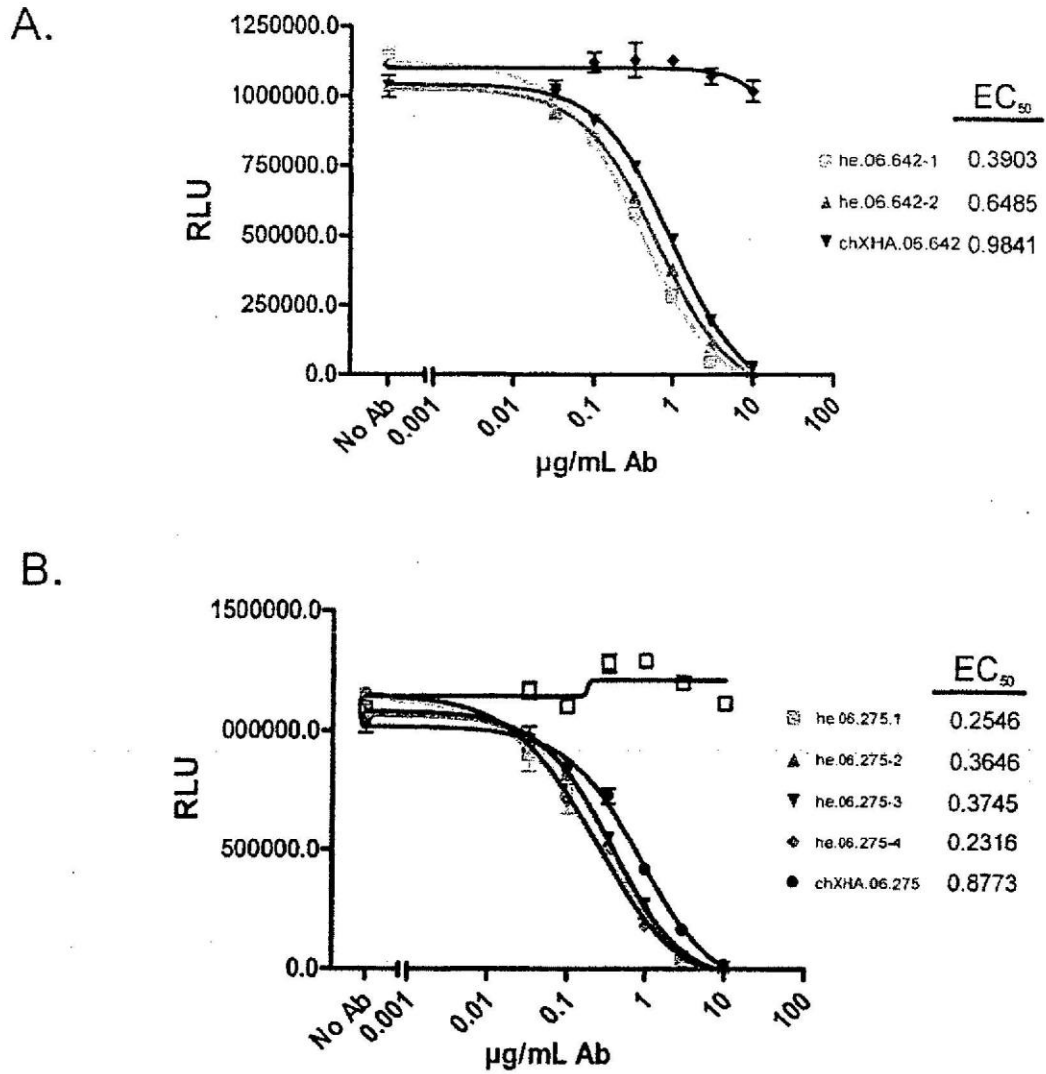
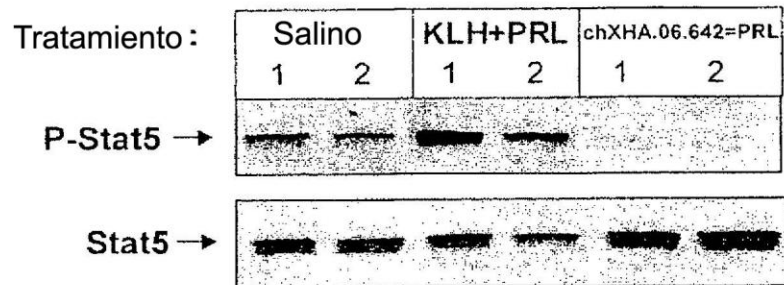


Figura 18

A.



B.

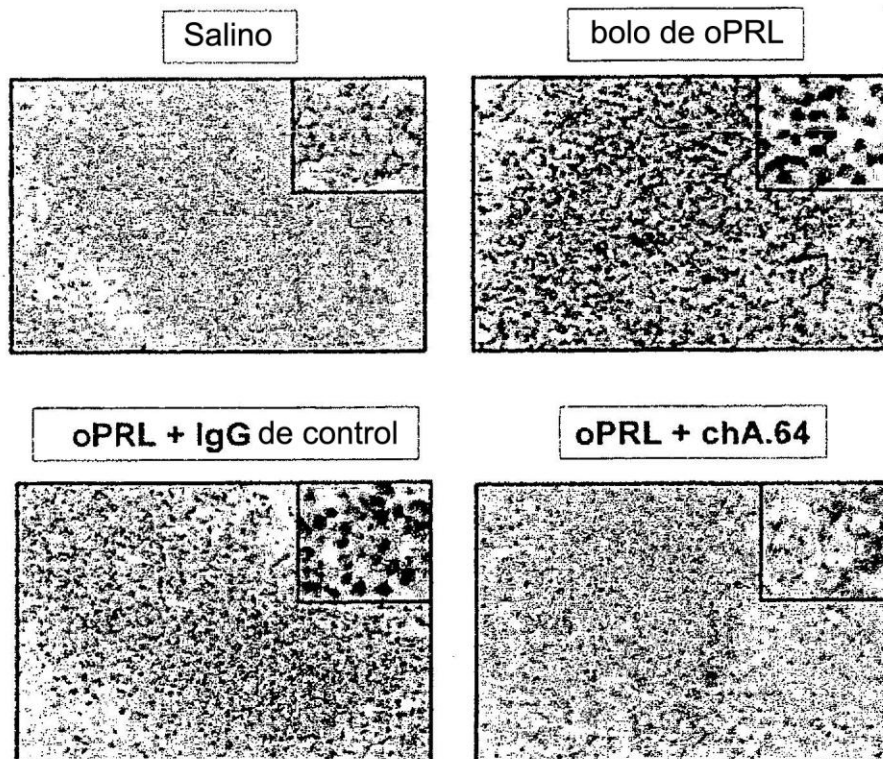


Figura 19

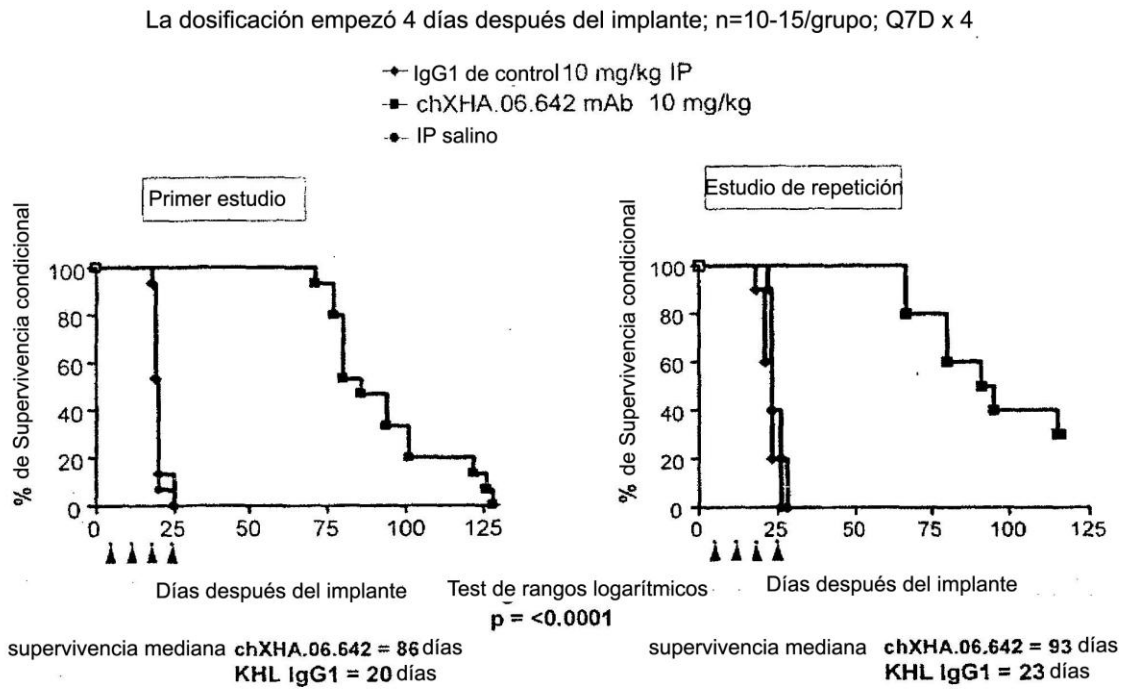


Figura 20

- La dosificación empezó 12 días después de la implantación celular, cuando los volúmenes tumorales promediaron 135 mm³

- Al de 21 días después del implante los volúmenes tumorales en ratones tratados con KLH > 600 mm³ y los tumores retrocedieron en tumores tratados con chXHA.06.642

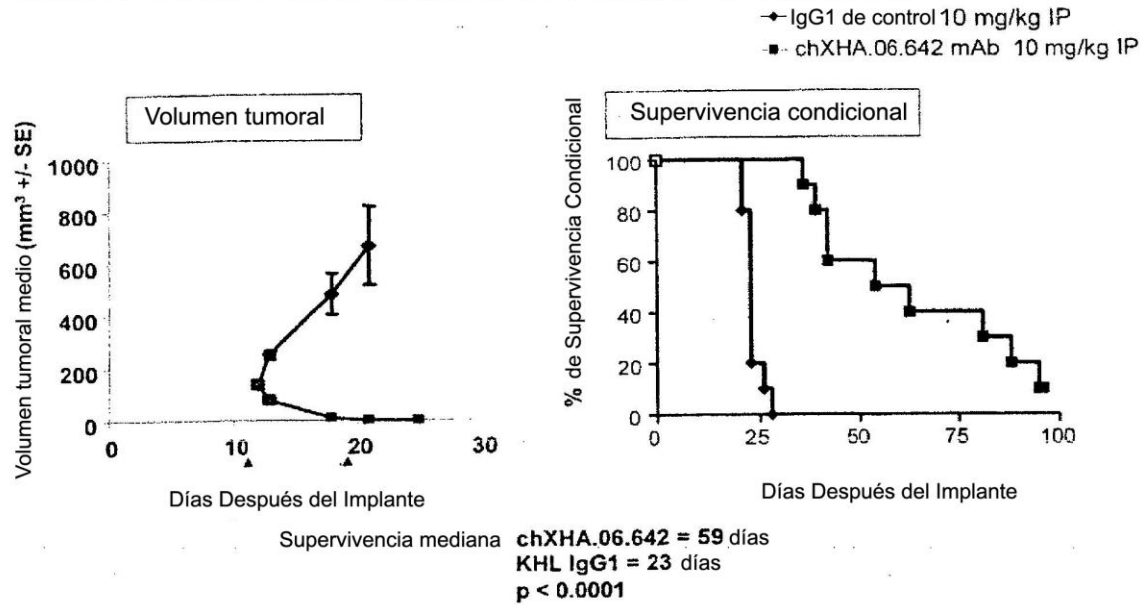
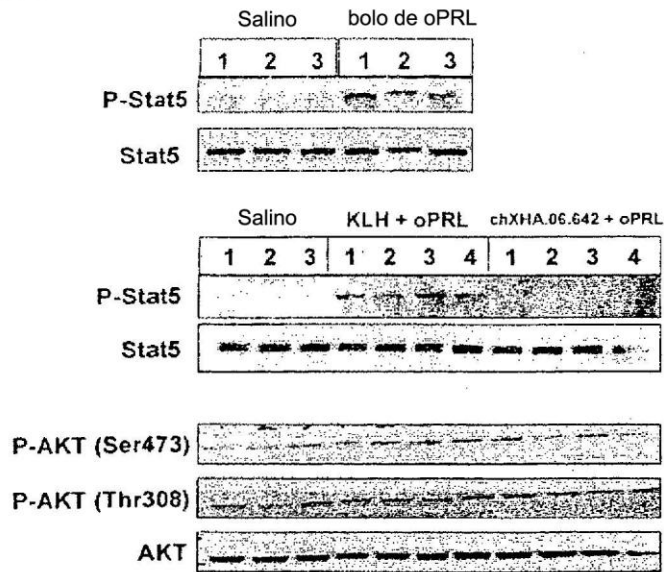


Figura 21

A.



B.

