



ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 462 690

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

12 TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 04.02.2009 E 09708703 (5)
- (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 09.04.2014 EP 2240203
- (54) Título: Anticuerpos alfa 5-beta 1 y sus usos
- (30) Prioridad:

05.02.2008 US 26207 P 09.09.2008 US 95429 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 26.05.2014

(73) Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (50.0%) Route 206 and Province Line Road Princeton, NJ 08540, US y PFIZER INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

**BENDER, STEVEN LEE; CASPERSON, GERALD FRIES; HU-LOWE, DANA DAN;** JIANG, XIN; LI, GANG; **NORTH, MICHAEL AIDAN; WANG, JIANYING;** WICKMAN, GRANT; BRAMS, PETER; **HUANG, HAICHUN; DEVAUX, BRIGITTE;** CHEN, HAIBIN; TANAMACHI, DAWN M.; TOY, KRISTOPHER; YANG, LAN; SPROUL, TIM W. y YAMANAKA, MARK

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

S 2 462 690 T3

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

## **DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos alfa 5-beta 1 y sus usos

#### Campo de la invención

La presente descripción se refiere a anticuerpos y partes de unión al antígeno de los mismos que se unen a α5β1. La descripción también se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican dichos anticuerpos y partes de unión al antígeno, a métodos para hacer anticuerpos contra α5β1 y partes de unión al antígeno, a composiciones que comprenden estos anticuerpos y partes de unión al antígeno y a métodos de uso de los anticuerpos, partes de unión al antígeno y composiciones.

#### **Antecedentes**

- La integrina α5β1 es una proteína de superficie celular heterodímera que se une a la fibronectina y está implicada en la unión celular y angiogénesis. Este heterodímero está compuesto de una subunidad α5 y una subunidad β1. La integrina α5β1 se denomina el "receptor de fibronectina clásico" y tiene funciones principales en la adhesión a la matriz, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia. Aunque varias integrinas se unen a la fibronectina (FN), la α5β1 es selectiva para la FN ya que requiere tanto las secuencias peptídicas de las repeticiones novena (PHSRN) como décima (RGDS) de tipo 3 de la FN para el reconocimiento de ligando y la interacción óptima. (Danen et al. *J. Biol. Chem.* 270(37):21612-21618 (1995); Redick et al. *J. Cell Biol.* 149(2):521-527 (2000); Takagi et al. *EMBO J.* 22:4607-4615 (2003)). La adhesión celular mediada por integrina a la FN puede producir flujos de calcio, activar tirosina y serina/treonina proteína quinasas y el metabolismo de lípidos por inositol, y regula la actividad de la familia Rho de las GTPasas pequeñas que controla el citoesqueleto de actina y desarrollo del ciclo celular.
- La expresión de la α5β1se observa en la mayoría de los tejidos embrionarios, pero el nivel disminuye después del nacimiento de una forma acorde con la diferenciación celular terminal (Muschler & Horwitz *Development* 113(1):327-337 (1991)). En ratones adultos genéticamente intactos, la expresión es principalmente en la vasculatura y el tejido conjuntivo, aunque el receptor está ampliamente distribuido en niveles bajos. La expresión tanto de α5β1 como de la FN son potenciadas de forma significativa y coordinada en los vasos sanguíneos en tumores humanos y en tejidos estimulados por citoquinas y factores de crecimiento. Las citoquinas angiogénicas tales como bFGF, VEGF, IL-8, TGF-beta, y TNF-α favorecen la expresión de α5β1 en células endoteliales in vitro e in vivo, mientras que estas moléculas son expresadas mínimamente en vasos y tejidos humanos normales (Kim et al. *Am. J. Path.* 156(4): 1345-62 (2000); Enaida et al. *Fukushima J. Med. Sci* 44(I):43-52 (1998); Klein et al. *Mol. Biol. Cell* 4(10):973-982 (1993)).
- Los niveles altos de expresión de α5β1 no están limitados a la vasculatura, ya que también se observa con frecuencia que las células tumorales expresan α5β1 en muchos tipos de cáncer. La hipoxia tumoral se ha asociado con la expresión tumoral aumentada de α5β1 (Mousa et al. *J. Cell. Biochem.* 74:135-143 (1999)). Se cree que las integrinas son importantes para la intravasación tumoral en capilares recién formados y la extravasación a sitios distantes, conduciendo a la extensión tumoral y enfermedad metastásica. En conjunto, el patrón de expresión de α5β1 está de acuerdo con muchas funciones en la promoción del cáncer, mediando las actividades tanto de las células estromales como tumorales. Varios estudios clínicos han asociado la regulación por aumento de α5β1 en las células tumorales con el avance del melanoma humano, carcinoma de células escamosas orales, y leucemias de linfocitos B (Jin & Varner, *Br. J. Cancer* 90:561-565 (2004); Danen et al. *Histopathology* 24(3):249-256 (1994); Shinohara et al., Am. *J. Clin. Pathol.* 111(1):75-88 (1999)).

# 40 Resumen

55

La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales humanos aislados que presentan una alta afinidad de unión a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  humana.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado capaz de unirse a la integrina α5β1, que comprende: (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 1; (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 2; (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 3; (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 4; (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 5; y (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6. Por ejemplo, el anticuerpo pertenece a una subclase que es capaz de inducir la ADCC, tal como la IgG1 o IgG3. La actividad de ADCC es el resultado de introducir modificaciones de hidratos de carbono, tal como patrones de glicosilación alterados, en la región Fc comparada con el patrón de hidratos de carbono natural.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada y ligera de los anticuerpos.

# ES 2 462 690 T3

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedante que comprende el vector de expresión.

5 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-α5β1 que comprende expresar el anticuerpo en la célula hospedante.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo, o la composición para usar en la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan la integrina α5β1.

En algunos casos, el anticuerpo se une a la integrina  $\alpha5\beta1$  humana con una  $K_D$  de 5 x  $10^{-8}$  M o menor, 2 x  $10^{-8}$  M o menor, 1 x  $10^{-9}$  M o menor, 5 x  $10^{-9}$  M o menor, 4 x  $10^{-9}$  M o menor, 3 x  $10^{-9}$  M o menor, 0 2,7 x  $10^{-9}$  M o menor.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

El anticuerpo de la invención presenta una actividad de ADCC debida a al menos una mutación en la región Fc comparada con la región Fc natural, y la actividad de ADCC potenciada es respecto al mismo anticuerpo anticuerpo, pero que comprende la región Fc natural. El anticuerpo de la invención se une a la integrina α5β1 humana con una K<sub>D</sub> de 5 x 10<sup>-8</sup> M o menor, 2 x 10<sup>-8</sup> M o menor, 1 x 10<sup>-8</sup> M o menor, 5 x 10<sup>-9</sup> M o menor, 4 x 10<sup>-9</sup> M o menor, 3 x 10<sup>-9</sup> M o menor, 3 x 10<sup>-9</sup> M o menor, 2,7 x 10<sup>-9</sup> M o menor. En ejemplos adicionales, el anticuerpo demuestra una actividad de ADCC potenciada con respecto a un anticuerpo comparable que es al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 500 veces, o al menos 1000-veces comparada con un anticuerpo comparable, en donde el anticuerpo comparable es el mismo anticuerpo, pero con la región Fc natural.

El anticuerpo de la invención puede pertenecer a la subclase IgG1 y al menos un aminoácido en la región Fc de la subclase IgG1 está mutado. En un ejemplo adicional, la al menos una mutación ocurre en la posición de la serina 247, alanina 338 o isoleucina 340 en la región Fc de la subclase IgG1. En un ejemplo adicional, la al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en S247D, A338L y I340E. En un ejemplo adicional más, el anticuerpo comprende las mutaciones S247D, A338L y I340E.

El anticuerpo de la invención compite de forma cruzada o compite por la unión a la integrina α5β1 humana con un anticuerpo que comprende: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o modificaciones conservativas de la misma; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o modificaciones conservativas de la misma.

En una realización, la descripción proporciona el material depositado en la ATCC como depósito nº PTA-9377. En otra realización, la descripción proporciona el material depositado en la ATCC como depósito nº PTA-9378. En otra realización, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende la región variable de la cadena pesada como está depositada en la ATCC como depósito nº PTA-9377. En otra realización, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende la región variable de la cadena ligera como está depositada en la ATCC como depósito nº PTA-9378. En otra realización, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende la región variable de la cadena pesada como está depositada en la ATCC como depósito nº PTA-9377, pero en el que se han hecho las mutaciones de la línea germinal I30S y N33S en la región VH. En una realización adicional, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera como están depositadas en la ATCC como depósitos nº PTA-9377 y PTA-9378, respectivamente, o dicho anticuerpo en el que se han hecho las mutaciones de la línea germinal I30S y N33S en la región VH. En una realización adicional, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de la región variable de la cadena pesada depositada en la ATCC como depósito nº PTA-9377, o comprende dichas CDR1, CDR2 y CDR3 cuando dicha región variable de la cadena pesada contiene las mutaciones de la línea germinal I30S y N33S. En una realización adicional, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de la región variable de la cadena ligera depositada en la ATCC como depósito nº PTA-9378. En una realización adicional, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de las regiones variables de la cadena pesada y ligera depositadas en la ATCC como depósitos nº PTA-9377 y PTA-9378, respectivamente, o comprende dichas CDR1, CDR2 y CDR3 cuando dicha región variable de la cadena pesada contiene las mutaciones germinales I30S y N33S.

Los anticuerpos de la descripción pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, de una subclase IgG1 o IgG4. En un caso, la presente descripción proporciona cualquiera de los anticuerpos descritos antes, que es un anticuerpo humano de longitud completa de subclase IgG1, en donde al menos un aminoácido en la región Fc de la subclase IgG1 está mutado. En un caso adicional, la al menos una mutación ocurre en la posición de la serina 247, alanina 338 o isoleucina 340. En un caso adicional, la al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en S247D, A338L y I340E. En un caso adicional más, el anticuerpo comprende las mutaciones S247D, A338L y I340E.

En algunas realizaciones, la lisina C-terminal de la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos anti- $\alpha5\beta1$  de la

descripción como se describen, se ha escindido, y por lo tanto no está presente. Por ejemplo, en algunas realizaciones los anticuerpos de la presente descripción comprenden la región pesada constante de IgG1 como se muestra en la SEQ ID NO: 43, pero donde la lisina C-terminal no está presente. En varios casos, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-α5β1 pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden estar en un inmunoconjugado unido a un agente terapéutico. En un caso, el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radiactivo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos también están abarcadas por la descripción, así como los vectores de expresión que comprenden dichos ácido nucleicos y las células hospedantes que comprenden dichos vectores de expresión. Un aspecto, por ejemplo, es una molécula de ácido nucleico aislada, o un vector de expresión, que comprende la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 11, o modificaciones conservativas de la misma, y la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 12, o modificaciones conservativas de la misma.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos de la invención para usar en la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan la integrina α5β1. Estas células pueden ser células de cáncer incluyendo, pero no limitado a mesotelioma, hepatobiliar (hepático y el conducto biliar), un tumor primario o secundario del SNC, un tumor cerebral primario o secundario, cáncer de pulmón (NSCLC y SCLC), cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, gastrointestinal (gástrico, colorrectal, y duodenal), cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, linfoma de no Hodgkins, tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, adenoma de la pituitaria, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos que no deben considerarse como limitantes.

# 30 Breve descripción de los dibujos

10

15

20

25

35

40

45

50

Los dibujos se refieren a 4 tipos de anticuerpos, en concreto 22B5, 24C7, 1D9 y 2D2. Los anticuerpos 24C7, 1D9 y 2D2 están incluidos con propósito de comparación y no forman parte de la invención.

La figura 1A muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 22B5 (SEQ ID NO: 11); la figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 22B5 (SEQ ID NO: 7) las regiones CDR están subrayadas; la figura 1C muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 22B5 (SEQ ID NO: 12); la figura 1D muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 22B5 (SEQ ID NO: 8) - las regiones CDR están subrayadas; la figura 1E muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 24C7 (SEQ ID NO: 21); la figura 1F muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 24C7 (SEQ ID NO: 19) - las regiones CDR están subrayadas; la figura 1G muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 24C7 (SEQ ID NO: 22); la figura 1H muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 24C7 (SEQ ID NO: 20) - las regiones CDR están subrayadas; la figura 11 muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 1D9 (SEQ ID NO: 31); la figura 1J muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1D9 (SEQ ID NO: 29) - las regiones CDR están subrayadas. La figura 1K muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 1D9 (SEQ ID NO: 32); la figura 1L muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1D9 (SEQ ID NO: 30) - las regiones CDR están subrayadas; la figura 1M muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 2D2 (SEQ ID NO: 41); la figura 1N muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2D2 (SEQ ID NO: 39) - las regiones CDR están subrayadas; la figura 10 muestra la secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 2D2 (SEQ ID NO: 42); la figura 1P muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2D2 (SEQ ID NO: 40) - las regiones CDR están subrayadas; la figura 1Q muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 con las mutaciones S247D, A338L y I340E subrayadas; y la figura 1R muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de la IgG1.

La figura 2 muestra el alineamiento del dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) de 22B5 con la correspondiente secuencia de la línea germinal. También se muestra el alineamiento del dominio variable de la cadena ligera (V<sub>k</sub>) de 22B5 con la correspondiente secuencia de la línea germinal. Las regiones CDR están subrayadas, los restos idénticos se representan por guiones y los puntos indican eliminaciones.

# ES 2 462 690 T3

La figura 3 muestra la sobreimpresión de los sensogramas obtenidos por inyección de diferentes concentraciones del dominio extracelular recombinante de  $\alpha5\beta1$  sobre 22B5/DLE inmovilizado. Estos datos se recogieron en presencia de CaCl<sub>2</sub> 4,0 M. El orden de las inyecciones era de concentración baja a alta.

La figura 4 muestra la unión dependiente de la dosis de 22B5/DLE a HUVEC por FACS.

5 La figura 5 muestra las constantes de equilibrio de disociación que compran los receptores de Fcγ humano y de ratón. "wt" se refiere a la IgG1 natural 22B5; "DLE" se refiere a 22B5/DLE.

La figura 6 muestra los resultados de un ensayo de bloqueo de adhesión celular de HUVEC. Los resultados indican el nivel de inhibición de la adhesión de HUVEC a la fibronectina para 22B5 y diferentes subclases variantes así como el control negativo (IgG1 BHA2). También se muestran los valores de Cl<sub>50</sub> calculados.

10 La figura 7 muestra la expresión de α5 humano a partir de HUVEC y 20 líneas de células tumorales, medida por transferencia Western.

La figura 8 muestra la ADCC in vitro inducida por 22B5/DLE comparado con 22B5 IgG1 natural. La figura 8A muestra un ensayo de detección basado en LDH que mide la ADCC de células U87MG en presencia de PBMC humanas por 22B5/DLE y 22B5 IgG1 natural. La figura 8B muestra un ensayo de detección basado en ToxiLight que mide la ADCC de HUVEC en presencia de PBMC humanas por 22B5/DLE y 22B5 IgG1 natural.

La figura 9 muestra ensayos de detección basados en LDH que indican una potenciación sustancial de la ADCC de 22B5/DLE frente a la 22B5 IgG1 natural para un amplio intervalo de niveles de expresión de antígeno.

La figura 10 muestra la actividad de inhibición de 22B5/DLE en el modelo de metástasis experimental A549-Luc. Figura 10A: volumen de metástasis pulmonar medido por BLI la semana 8 (n=11 para el grupo de control, n=14 para el grupo de 22B5 IgG2 y n=12 para el grupo de 22B5/DLE). Figura 10B: recrecimiento de tumores pulmonares en el grupo tratado con 22B5 IgG2 después de detener la administración. Por comparación, el grupo tratado con 22B5/DLE mostró poco recrecimiento. Figura 10C: gráfica de Kaplan-Meier de la tasa de supervivencia animal de cada grupo de tratamiento (punto final = BLI 1x10<sup>8</sup> fotones/segundo), p< 0,0001 para el grupo de control de vehículo comparado con todos los demás grupos, y p<0,05 para la comparación entre grupos de 22B5/DLE y 22B5 IgG2.

La figura 11 muestra la unión dependiente de la dosis de 1D9, 1D9/DLE, 24C7/DLE, 2D2/DLE, 22B5 y 22B5/DLE a HUVEC por FACS.

La figura 12 muestra la ADCC in vitro inducida por 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE y 24C7/DLE.

La figura 13 muestra la eficacia antitumoral dependiente de ADCC de 1D9/DLE en un modelo singénico de metástasis de melanoma. Figura 13A: aspecto macroscópico de pulmones extirpados de todos los grupos. Figura 3B: cuantificación del peso pulmonar (\*p<0,05, 1D9 IgG1 DLE frente a 1D9 IgG2). Figura 13C: cuantificación de los números de colonias metastásicas visibles en la superficie pulmonar. Análisis estadístico por ANOVA y ensayo de comparación múltiple de Bonferroni (\*p<0,05, IgG1 1D9 DLE frente a 1D9 IgG2; \*p<0,05, 1D9 IgG1 DLE frente a anti-KLH IgG2).

## Descripción detallada

15

20

30

45

50

- 35 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos aislados que se unen específicamente a α5β1 con alta afinidad. En algunos casos, los anticuerpos de la descripción derivan de secuencias de la línea germinal de la cadena pesada y ligera particulares y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La descripción proporciona anticuerpos aislados y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos.
- 40 Con el fin de que la presente descripción se entienda mejor, se definen primero algunos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Salvo que se define otra cosa en la presente memoria, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente descripción tendrán los significados entendidos normalmente por los expertos en la técnica. Además, salvo que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán la pluralidad y los términos en plural incluirán los singulares. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritos en la presente memoria, son los conocidos y usados habitualmente en la técnica.

Los métodos y técnicas de la presente descripción en general se llevan a cabo con los métodos bien conocidos en la técnica y como se describen en diferentes referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva salvo que se indique otra cosa. Dichas referencias incluyen, p. ej., Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002), y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se

llevan a cabo normalmente en la técnica o como se describen en la presente memoria. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria, son las bien conocidas y usadas habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes.

Como se usa en la presente memoria, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con el mismo en esta sección.

Los artículos "un", "una" se usan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

10

35

40

45

50

55

Como se usa en la presente memoria, los 20 aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase, *Immunology--A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Los términos "α5β1" e "integrina α5β1" se usan de forma intercambiable, e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especie de la α5β1 humana. La α5β1 humana natural, por ejemplo, está compuesta de la subunidad α5 (que deriva de una secuencia precursora que es escindida sustancialmente en dos cadenas que están unidas por un enlace disulfuro) (nº de acceso en Genbank P08648) y una subunidad β1 (que deriva de una secuencia precursora que es procesada sustancialmente en una forma madura (nº de acceso en Genbak P05556-1). Se sabe que la subunidad β1 existe como varias isoformas producidas por corte y empalme alternativo (nº de acceso en P05556-2, P05556-3, P05556-4 y P05556-5). Los anticuerpos contra α5β1 humana de la descripción, en determinados casos, pueden reaccionar de forma cruzada con α5β1 de otras especies distintas de la humana. En otros casos, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para α5β1 humana y pueden no presentar reactividad cruzada con otras especies o de otro tipo.

Una "respuesta inmunitaria", como entendería el experto en la técnica incluye, pero no se limita a cualquier activación alogénica o específica de antígeno detectable de una respuesta de linfocitos T cooperadores o linfocitos T citotóxicos, producción de anticuerpo, activación mediada por linfocitos T de reacciones alérgicas, y similares. La expresión abarca la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas y complemento) que produce el daño selectivo de, la destrucción de o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que tienen una función en la transmisión de una señal desde una parte de una célula a otra parte de una célula. Como se usa en la presente memoria, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente descripción es la integrina  $\alpha5\beta1$ .

El término "anticuerpo" como se denomina en la presente memoria, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "parte de unión al antígeno") o cadenas sencillas del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión al antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria V<sub>H</sub>) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta de 3 dominios. CH1. CH2 V C<sub>H3</sub>. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (abreviada V<sub>L</sub>) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, C<sub>L</sub>. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden subdividir además en regiones de hipersensibilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones armazón (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta de 3 CDR y 4 FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedante, incluyendo diferentes células del sistemas inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, en general, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

La expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte del anticuerpo"), como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej.,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1). Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo la

pueden llevar a cabo fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , son codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permita hacerlos como una sola cadena de proteína en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se asocian para formar una molécula monovalente (conocida como Fv monocatenario (scFv); véase, p. ej., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que estos anticuerpos monocatenarios están abarcados dentro de la expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden obtener usando cualquier técnica adecuada incluyendo técnicas convencionales conocidas para el experto en la técnica, y los fragmentos se pueden cribar de acuerdo con la utilidad de la misma forma que los anticuerpos intactos.

10

15

20

45

50

55

60

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a un anticuerpo que carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antígenas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a  $\alpha 5\beta 1$  carece sustancialmente de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de  $\alpha 5\beta 1$ ). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a  $\alpha 5\beta 1$  puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas  $\alpha 5\beta 1$  de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede carecer sustancialmente de otro material celular y/o químico.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en la presente memoria, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad y afinidad de unión por un epítopo particular.

Las expresiones "anticuerpo humano" o "anticuerpo totalmente humano", como se usan en la presente memoria, se pretende que incluyan anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones armazón como CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la descripción o partes de unión al antígeno de los mismos, pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente memoria, no se pretende que incluya anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias armazón humanas.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal humano" o "anticuerpo monoclonal totalmente humano" se refieren a anticuerpos que presentan una especificidad de unión única que tienen regiones variables en las que tanto las regiones armazón como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, p. ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera, donde el linfocito B está fusionado con una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo recombinante humano", como se usa en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es un transgénico o transcromosómico para genes de inmnoglubulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito con más detalle a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedante transformada para expresar el anticuerpo humano, p. ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de un biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables en las que las regiones armazón y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en algunas realizaciones, dichos anticuerpos recombinantes humanos se pueden someter a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de lg humana, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

Como se usa en la presente memoria, "isotipo" o "clase" se refiere a la clase de anticuerpo (p. ej., IgM o IgG) que es codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada. Los dominios constantes de los anticuerpos no están implicados en la unión al antígeno, pero presentan diferentes funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, un anticuerpo o inmunoglobulina humana dada se puede asignar a una de las 5 clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Las

estructuras y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. De las diferentes clases de inmunoglobulinas humanas, solo las IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, e IgM humanas se sabe que activan el complemento. Se sabe que IgG1 e IgG3 humanas median la ADCC en seres humanos.

Como se usa en la presente memoria, "subclase" se refiere a la especificación adicional dentro de un isotipo del gen de la región constante de la cadena pesada, tal como, por ejemplo, las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 dentro del isotipo IgG.

5

10

15

20

25

30

35

Como se usa en la presente memoria, el término "compuesto" o "compuestos farmacéutico" incluye anticuerpos, partes de unión al antígeno de los mismos, inmnoconjugados y moléculas biespecíficas.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de forma intercambiable en la presente memoria con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas (p. ej., células NK, neutrófilos, macrófagos, etc.) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. Dicha células citotóxicas que median la ADCC en general expresan receptores de Fc (FcR). Las células primarias que median la ADCC (células NK) expresan FcyRIII, mientras que los monocitos expresan FcyRI, FcyRIII, FcyRIII y/o FcyRIV. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula, se puede llevar a cabo un ensayo de ADCC in vitro, tal como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citotóxicas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de las moléculas de interés se puede evaluar in vivo, p. ej., en un modelo natural tal como el que describen Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA), 95:652-656 (1998).

Las expresiones "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo donde la región Fc comprende una región bisagra y los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada. Por ejemplo, el FcR puede ser un FcR humano de secuencia natural. El FcR puede ser uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los recetores de las subclases FcyRl, FcyRll, FcyRll y FcyRlV, incluyendo las variantes alélicas y las formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcyRII incluyen FcyRIIA (un "receptor activante") y FcyRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activante FcyRIIA contiene un motivo de activación en inmunorreceptor basado de tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcvRIIB contiene un motivo de activación en inmunorreceptor basado de tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático (véase, Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se van a identificar en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en la presente memoria. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., Immunol., 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)). El sitio de unión del FcR primario en los fragmentos Fc de inmunoglobulina reside en la región bisagra entre los dominios C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2. Esta región bisagra interacciona con el FcR1-3 en diferentes leucocitos y hace que estas células ataquen el objetivo (Wines et al., J. Immunol., 164:5313-5318 (2000)). La región bisagra abarca, pero no se limita a las secuencias descritas en la patente de EE.UU. nº 6.165.476.

La expresión "capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" se refiere a la capacidad de un agente, tal como un anticuerpo, para demostrar ADCC medida por ensayo(s) conocido(s) para los expertos en la técnica. Dicha actividad típicamente se caracteriza por la unión de la región Fc a diferentes FcR. Sin estar limitados por ningún mecanismo particular, los expertos en la técnica reconocen que la capacidad de un anticuerpo para demostrar ADCC puede ser, por ejemplo, en virtud de su subclase (tal como IgG1 o IgG3), por mutaciones introducidas en la región Fc, o en virtud de modificaciones de los patrones de hidratos de carbono en la región Fc del anticuerpo. Dichas modificaciones se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU. nº 2007-0092521.

La expresión "derivados de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, p. ej., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humanizado" se pretende que se refiera a anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias armazón humanas. Se pueden hacer modificaciones de la región armazón adicionales dentro de las secuencias armazón humanas.

La expresión "anticuerpo quimérico" se pretende que se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable derivan de una especie y las secuencias de la región constante derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante derivan de un anticuerpo humano.

Por la frase "se une específicamente" como se usa en la presente memoria, se entiende un compuesto, p. ej., una

proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo, y similares, que reconoce y se une a una molécula específica, pero no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo o un péptido inhibidor que reconoce y se une a un ligando cognado (p. ej., un anticuerpo anti-α5β1 que se une con su antígeno cognado, α5β1) en una muestra, pero no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en la muestra. Por lo tanto, en las condiciones de ensayo designadas, el resto de unión especificado (p. ej., un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo) se une con preferencia a una molécula diana particular, p. ej., α5β1, y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de ensayo. Se puede usar una variedad de formatos de ensayo para seleccionar un anticuerpo que se une específicamente a una molécula de interés. Por ejemplo, el inmunoensayo ELISA en fase sólida, inmunoprecipitación, BIAcore, FACS y análisis de inmunotransferencia Western, están entre los muchos ensayos que se pueden usar para identificar un anticuerpo que reacciona específicamente con α5β1. Típicamente, una reacción específica o selectiva será de al menos el doble que la señal de fondo o ruido y más típicamente de más de 10 veces la señal de fondo, incluso más específicamente, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno cuando la constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) es  $\leq 1 \mu M$ , por ejemplo  $\leq 100 n M$  y, además por ejemplo,  $\leq 10 n M$ .

5

10

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que "se une específicamente a la integrina α5β1 humana" se pretende que se refiera a un anticuerpo que se une a la integrina α5β1 humana con una  $K_D$  de 1 x 10<sup>-7</sup> M o menor, 5 x 10<sup>-8</sup> M o menor, 3 x 10<sup>-8</sup> M o menor, 1 x 10<sup>-8</sup> M o menor, 0 5 x 10<sup>-9</sup> M o menor.

El término " $k_{on}$ ", como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a la velocidad de formación, o velocidad de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " $k_{off}$ ", como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a la velocidad de disociación, o velocidad de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular. El término " $K_D$ ", como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de  $k_{off}$  a  $k_{on}$  (es decir,  $k_{off}/k_{on}$ ) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de  $K_D$  para anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la  $K_D$  de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón de superficie, típicamente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de 1 x  $10^{-7}$  M o menor, 5 x  $10^{-8}$  M o menor, o 5 x  $10^{-9}$  M o menor para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-6}$  M o menor,  $10^{-7}$  M o menor, o  $10^{-8}$  M o menor.

El término "compite", como se usa en la presente memoria, en relación con un anticuerpo, se refiere a cuando un primer anticuerpo, o una parte de unión al antígeno del mismo, compite por la unión con un segundo anticuerpo, o una parte de unión al antígeno del mismo, donde la unión del primer anticuerpo con su epítopo cognado disminuve de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo comparado con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítopo también disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítopo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítopo o ligando cognado, sea en la misma, mayor o menor extensión, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" uno con otro por la unión a su(s) respectivo(s) epítopo(s). Por ejemplo, los anticuerpos que compiten de forma cruzada se pueden unir al epítopo, o parte del epítopo, al que se unen los anticuerpos descritos en la presente memoria. El uso tanto de anticuerpos que compiten como que compiten de forma cruzada, está abarcado por la presente descripción. Independientemente del mecanismo por el que dicha competición o competición cruzada se produzca (p. ej., impedimento estérico, cambio conformacional, o unión a un epítopo común, o parte del mismo, y similares), el experto en la técnica apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, que dichos anticuerpos que compiten y/o compiten de forma cruzada están abarcados y pueden ser útiles para los métodos descritos en la presente memoria.

El término "epítopo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

"Glicoforma" se refiere a una estructura de oligosacáridos compleja que comprende uniones de diferentes unidades de hidratos de carbono. Dichas estructuras se describen en *Essentials of Glycobiology* Varki et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999), que también proporciona una revisión de la nomenclatura de glicobiología estándar. Dichas glicoformas incluyen, pero no se limitan a G2, G1, G0, G-1, y G-2 (véase, p. ej., publicación de patente internacional WO 99/22764).

"Patrón de glicosilación" se define como el patrón de unidades de hidratos de carbono que están unidas covalentemente a una proteína (p. ej., la glicoforma) así como al o a los sitios a los que la o las glicoformas están

covalentemente unidas a la cadena principal de una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglbulina.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferentes glicoformas y/o patrones de glicosilación comparados unos con otros. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por moléculas de ácidos nucleicos proporcionados en la presente memoria, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria, son parte de la presente descripción, independientemente de la glicosilación de dichos anticuerpos.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Como se usa en la presente memoria, el término "tratar" significa reducir la frecuencia con la que un paciente sufre los síntomas de una enfermedad (es decir, crecimiento tumoral y/o metástasis, u otro efecto mediado por el número y/o actividad de células inmunitarias, y similares). El término incluye la administración de compuestos o agentes de la presente descripción para prevenir o retrasar el inicio de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviar los síntomas o detener o inhibir el desarrollo posterior de la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos) o la supresión terapéutica o alivio de los síntomas después de mantifestarse la enfermedad.

En las siguientes subsecciones se describen con más detalle diferentes aspectos de la descripción.

## 20 Anticuerpos anti-α5β1

5

10

15

40

55

Los anticuerpos de la descripción se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a la  $\alpha5\beta1$  humana. Preferiblemente, un anticuerpo de la descripción se une a  $\alpha5\beta1$  con una afinidad alta, por ejemplo con una  $K_D$  de  $1x10^{-7}$  M o menor.

- Preferiblemente, el anticuerpo se une a la α5β1 humana con una K<sub>D</sub> de 5x10<sup>-8</sup> M o menor, 2x10<sup>-8</sup> M o menor, 5x10<sup>-9</sup> M o menor, 3x10<sup>-9</sup> M o menor, 0 2,7x10<sup>-9</sup> M o menor. Los ensayos para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos frente a α5β1 son conocidos en la técnica, incluyendo por ejemplo, análisis ELISA, transferencias Western, RIA y de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen con detalle en los ejemplos. Las cinéticas de unión (p. ej., afinidad de unión) de los anticuerpos también se pueden evaluar mediante ensayos conocidos en la técnica, tal como el análisis de Biacore.
- 30 Los anticuerpos anti-α5β1 de la presente descripción también son capaces de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Dicha funcionalidad se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de una subclase específica (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3), que incluyen mutaciones en el dominio Fc que pueden potenciar más el nivel de actividad de ADCC de un anticuerpo. Dichas mutaciones y métodos de medición de la ADCC se describen con más detalle en los ejemplos.

# 35 Anticuerpo monoclonal 22B5

Un anticuerpo ilustrativo de la descripción es el anticuerpo monoclonal humano 22B5, como se describe en los ejemplos 1 y 2. La secuencia de aminoácidos de  $V_H$  de 22B5 se muestra en la figura 1B y se expone en la SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de  $V_L$  de 22B5 se muestra en la figura 1D y se expone en la SEQ ID NO: 8. Como se muestra en la figura 1B y la figura 2, la región variable de la cadena pesada de 22B5 comprende dos mutaciones de vuelta a la secuencia de genes de la línea germinal humana. Es decir, 22B5 comprende una mutación de isoleucina en serina en el resto de aminoácido número 30 (I30S) y una mutación de asparagina a serina en el resto de aminoácido número 33 (N33S). Como se usa en la presente memoria, "22B5" se refiere al anticuerpo en donde se han hecho dichas mutaciones de la línea germinal en la región variable de la cadena pesada I30S y N33S.

- Dado que 22B5 se puede unir a α5β1, las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden "mezclar y asociar" con otros anticuerpos anti-α5β1 para crear moléculas de unión anti-α5β1 adicionales de la descripción. La unión a α5β1 de dichos anticuerpos "mezclados y asociados" se puede ensayar usando los ensayos descritos antes y en los ejemplos (p. ej., ELISA). En un caso, cuando las cadenas de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se mezclan y asocian, una secuencia de V<sub>H</sub> de una pareja V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> particular se sustituye por una secuencia de V<sub>H</sub> estructuralmente similar. Igualmente, en otro caso una secuencia de V<sub>L</sub> de una pareja V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> particular se sustituye por una secuencia de V<sub>L</sub> estructuralmente similar.
  - En otro aspecto, la descripción proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera de 22B5. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de  $V_H$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de  $V_H$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de  $V_H$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de  $V_L$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de  $V_L$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de  $V_L$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 6. Las

regiones CDR se diseñan usando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Dado que 22B5 se une a  $\alpha5\beta1$  y que la especificidad de la unión al antígeno la proporcionan principalmente las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de V<sub>H</sub> y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V<sub>L</sub> se pueden "mezclar y asociar" (es decir, se pueden mezclar y asociar CDR de diferentes anticuerpos para  $\alpha5\beta1$ , aunque cada anticuerpo típicamente contendrá una CDR1, CDR2 y CDR3 de V<sub>H</sub> y una CDR1, CDR2 y CDR3 de V<sub>L</sub>) para crear moléculas de unión anti- $\alpha5\beta1$  adicionales de la descripción. La unión a  $\alpha5\beta1$  de dichos anticuerpos "mezclados y asociados" se puede ensayar usando los ensayos de unión descritos antes y en los ejemplos (p. ej., análisis de ELISA, Biacore). En un caso, cuando las secuencias de las CDR de V<sub>H</sub> se mezclan y asocian, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V<sub>H</sub> particular se sustituye por una secuencia(s) de CDR estructuralmente similar. Igualmente, cuando las secuencias de CDR de V<sub>L</sub> se mezclan y asocian, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V<sub>L</sub> particular típicamente se sustituye por una secuencia(s) de CDR estructuralmente similar. Será fácilmente evidente para el experto en la técnica que las nuevas secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden crear sustituyendo una o más secuencias de regiones CDR de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> por secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR descritas en la presente memoria.

Por consiguiente, en un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, que comprende: (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; en donde el anticuerpo se une específicamente a α5β1; preferiblemente a α5β1 humana.

Anticuerpos que tienen secuencias de la línea germinal particulares

5

10

15

20

40

45

50

55

- En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o deriva de un gen V<sub>H</sub> 4-39 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a α5β1. En otro aspecto más, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal humano, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o deriva de un gen de V<sub>k</sub> L6 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a α5β1. En otro aspecto ilustrativo más, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, en donde el anticuerpo:
  - (a) comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o deriva de un gen VH 4-9 humano (cuyo gen codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7);
  - (b) comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o deriva del gen  $V_k$  L6 (cuyo gen codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8); y
- 35 (v) se une específicamente a  $\alpha5\beta1$ , preferiblemente a  $\alpha5\beta1$  humana.

Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de V<sub>H</sub> 4-39 y V<sub>K</sub> L6, respectivamente es 22B5.

Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "derivan de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribar una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentada sobre fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar como tal, comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que está más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos comparada con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas naturales o la introducción deliberada de mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como que es humano cuando se compara con secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (p. ei., secuencias de línea germinal murina). En algunos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. En algunos casos, el anticuerpo humano es idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de Ig de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular presentará diferencias de como máximo 10 aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En algunos casos, el anticuerpo humano puede presentar como máximo 5, o incluso como máximo 4, 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos genomanipulados y modificados

15

20

35

40

45

50

55

Un anticuerpo de la descripción se puede preparar además usando un anticuerpo que tiene una o más secuencias de la V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> descritas en la presente memoria, como material de partida para producir por genomanipulación un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede genomanipular modificando uno o más restos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub>), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones armazón.

Adicionalmente o alternativamente, un anticuerpo se puede genomanipular modificando restos dentro de la o las regiones constantes, por ejemplo, para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de genomanipulación de la región variable que se puede realizar es el injerto de CDR. Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente a través de los restos de aminoácidos que están localizados en las 6 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de las CDR son responsables para la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, se pueden expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertadas en secuencias armazón de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, p. ej., Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; patente de EE.UU. nº 5.225.539 de Winter, y patentes de EE.UU. nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Por consiguiente, otro aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión al antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias de las CDR de la V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo monoclonal 22B5, aunque pueden contener diferentes secuencias armazón respecto a estos anticuerpos.

Dichas secuencias armazón se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ADN de la línea germinal para la región variable de la cadena pesada y ligera humana en la base de datos de la secuencia de la línea germinal humana "VBase" (disponible en internet en <a href="www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase">www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase</a>), así como en Kabat, E. A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH; Tomlinson, I. M., et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J.P.L. et al. (1994), *Eur. J. Immunol.* 24:827-836). Como otro ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humanas en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de línea germinal de la cadena pesada encontradas en HCo7 HuMAb de ratón están disponibles en los números de acceso en Genbank que acompañan: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 y BC070333), 3-33 (NG\_0010109 y NT\_024637) y 3-7 (NG\_0010109 y NT\_024637). Como otro ejemplo, las siguientes secuencias de línea germinal de la cadena pesada encontradas en el ratón HCo12 HuMAb están disponibles en los números de acceso en Genbank que acompañan: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 y BC070333), 5-51 (NG\_0010109 y NT\_024637), 4-34 (NG\_0010109 y NT\_024637), 3-30.3 (X92283), y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias armazón para usar en los anticuerpos de la descripción incluyen, pero no se limitan a aquellos que son estructuralmente similares a las secuencias armazón usadas por los anticuerpos seleccionados de la descripción, p. ej., similares a las secuencias armazón de  $V_H$  4-39 y/o las secuencias armazón de  $V_L$  6 usadas por los anticuerpos monoclonales ilustrativos de la descripción. Por ejemplo, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$ , se pueden injertar en regiones armazón que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del cual deriva la secuencia armazón, o las secuencias de CDR se puede injertar en las regiones armazón que contienen una o más mutaciones comparadas con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en determinados casos, es beneficioso mutar restos dentro de las regiones armazón para mantener o potenciar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véase, p. ej., patentes de EE.UU.  $n^o$  5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Los anticuerpos genomanipulados de la descripción incluyen aquellos en los que las modificaciones se han hecho en restos de la región armazón dentro de  $V_H$  y/o  $V_L$ , p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones de la región armazón se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por

ejemplo, un procedimiento es "volver a mutar" uno o más restos de la región armazón a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido mutación somática puede contener restos de la región armazón que difieren de la secuencia de la línea germinal de la cual deriva el anticuerpo. Dichos restos se pueden identificar comparando las secuencias armazón del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la cual deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región armazón a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "volver a mutar" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por la PCR.

Otro tipo de modificación de la región armazón implica mutar uno o más restos dentro de la región armazón, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopos de linfocitos T para así reducir la potencial inmunogenicidad del anticuerpo. Este procedimiento se denomina también "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de EE.UU. nº 20030153043 de Carr et al.

10

15

45

50

55

Además o de forma alternativa a las modificaciones hechas en la región armazón o las regiones CDR, los anticuerpos de la descripción se puede genomanipular para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en el suero, fijación del complemento, unión al receptor de Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la descripción se puede modificar químicamente (p. ej., se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada uno de estos aspectos se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

- En un caso, la región bisagra de CH1 se modifica de modo que el número de restos de cisteína en la región bisagra se altera, p. ej., aumenta o disminuye. Este procedimiento se describe con más detalle en la patente de EE.UU. nº 5.677.425 de Bodmer et al. El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.
- En otro caso, la región bisagra Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfase de dominios CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc de modo que el anticuerpo tiene la unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada con respecto a la unión a SpA del dominio bisagra Fc natural. Este procedimiento se describe con más detalle en la patente de EE.UU. nº 6.165.745 de Ward et al.
- En otro caso, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diferentes procedimientos. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítopo de unión al receptor de recuperación tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.
- En otros casos más, la región Fc se altera sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 por un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector para el cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este procedimiento se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. nº 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

En otro caso, se pueden sustituir uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 por un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga alterada la unión a C1q y/o reducida o anulada la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Este procedimiento se describe con más detalle en la patente de EE.UU. nº 6.194.551 de Idusogie et al.

En otro ejemplo, se alteran uno o más restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este procedimiento se describe con más detalle en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fcy modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 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 o 439. Este procedimiento se describe con más detalle en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en la IgG1 humana para FcyRII, FcyRIII y FcRn se han cartografiado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase, Shields, R.L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se mostró que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoraban la unión a FcyRIII. Adicionalmente, se mostró que la siguiente combinación de mutantes

mejoraba la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Por ejemplo, el anticuerpo 22B5/DLE descrito en la presente memoria usa la subclase IgG1 del isotipo IgG, pero ha incorporado las siguientes mutaciones (comparado con la subclase IgG1 natural) mediante mutagénesis dirigida: S247D; A338L; y I340E. Igualmente, como se describe con más detalle a continuación, dichas mutaciones S247D, A338L, y I340E se han introducido en los anticuerpos monoclonales 24C7, 1D9 y 2D2. Como se describe con más detalle en los ejemplos, dichas mutaciones pueden aumentar la afinidad del anticuerpo frente a los receptores de Fcγ y por lo tanto aumentar su función efectora. Por lo tanto, la descripción proporciona un anticuerpo que comprende al menos una mutación en la región Fc y tiene respuesta de ADCC mayor de forma detectable que otro anticuerpo por lo demás idéntico que no comprende la al menos una mutación.

En otro ejemplo más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se puede llevar a cabo, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región armazón de la región variable para así eliminar la gliosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho procedimiento se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. nº 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

Adicional o alternativamente, se puede hacer un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tiene más estructuras de GlcNac de bisección. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se pueden llevar a cabo, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula hospedante con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células hospedantes en las que expresar anticuerpos recombinantes de la descripción para producir, de este modo, un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (alfa(1,6)fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704. Ms705 v Ms709 carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Las líneas celulares Ms704. Ms705 y Ms709 FUT8 f se crearon mediante alteración dirigida del gen de la FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase la publicación de patente de EE.UU. nº 20040110704 de Yamane et al. y Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol. Bioeng. 87: 614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai et al. describe una línea celular con un gen de FUT8 alterado funcionalmente que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace alfa-1,6. Hanai et al. también describen líneas celulares que tienen una actividad enzimática baja para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tienen la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir la fucosa a hidratos de carbono unidos a Asn(297), dando también como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en dicha célula hospedante (véase también, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares genomanipuladas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares genomanipuladas presentan estructuras GlcNac de bisección que tiene como resultado una mayor actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180). Alternativamente, los restos de fucosa del anticuerpo se pueden escindir usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina restos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente memoria contemplada por la descripción es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegilar para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Típicamente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en la presente memoria, el término "polietilenglicol" se pretende que abarque cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tal como mono alcoxi(C1-C10) o ariloxi-polietilengicol o polietilenglicol-maleimida. En algunos casos, el anticuerpo que se va a pegilar es un anticuerpo aglicosilado. En la técnica se conocen métodos para pegilar proteínas y se pueden aplicar a los anticuerpos de la presente descripción. Por ejemplo, véase el documento EP 0154316 de Nishimura et al. y el documento EP 0401384 de Ishikawa et al.

Métodos de genomanipulación de anticuerpos

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Como se ha discutido anteriormente, los anticuerpos anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 que tienen secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  descritas en la presente memoria, se pueden usar para crear nuevos anticuerpos anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 modificando las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$ , o la o las regiones constantes unidas a las mismas. Por tanto, en otro aspecto de la descripción, las características estructurales de un anticuerpo anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 de la descripción, p. ej. 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2, se usan

para crear anticuerpos anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la descripción, tal como la unión a la  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 humana. Por ejemplo, se pueden combinar de forma recombinante una o más regiones CDR de 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2, o mutaciones de las mismas, con regiones armazón conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1, genomanipulados de forma recombinante, adicionales, de la descripción, como se ha discutido antes. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección previa. El material de partida para el método de genomanipulación es una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  proporcionadas en la presente memoria, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  proporcionadas en la presente memoria, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la o las secuencias se puede usar como material de partida para crear una "segunda generación" de secuencia(s) derivada(s) de la o las secuencias originales y después la "segunda generación" de secuencia(s) se prepara y expresa como una proteína.

Se pueden usar técnicas de biología molecular convencionales para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

- Preferiblemente, el anticuerpo codificado por la o las secuencias de anticuerpo alteradas, es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-α5β1 descritos en la presente memoria, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a:
  - (i) se une a  $\alpha 5\beta 1$  humana con una  $K_D$  de  $1x10^{-7}$  M o menor;
  - (ii) es capaz de inducid ADCC.

10

25

35

- Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en la presente memoria, tales como los expuestos en los ejemplos (p. ej., citometría de flujo, ensayos de unión).
  - Las mutaciones se pueden introducir de forma aleatoria o selectiva a lo largo de todo o parte de una secuencia que codifica el anticuerpo anti-α5β1 y los anticuerpos anti-α5β1 modificados resultantes se pueden seleccionar por su actividad de unión y/u otras propiedades funcionales descritas en la presente memoria. En la técnica se describen métodos de mutación. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, ensamblaje por ligado sintético o una combinación de los mismos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar et al. describe métodos de uso de métodos de selección computacionales para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.
- 30 Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la descripción
  - Otro aspecto de la descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la descripción. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aísla" o se "convierte en sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante cualquier técnica adecuada, incluido tratamiento alcalino/SDA, bandas con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros. Véase F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la descripción puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y pueden contener o no secuencias intrónicas. Típicamente, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.
- Los ácidos nucleicos de la descripción se pueden obtener usando cualquier técnica de biología molecular adecuada. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (p. ej., hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe con más detalle más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo preparado por el hibridoma se pueden obtener mediante técnicas de amplificación por PCR o de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una genoteca de inmunoglobulina (p. ej., usando técnicas de presentación en fago), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede recuperar de la genoteca.
  - Las moléculas de ácidos nucleicos de la descripción incluyen, por ejemplo, las que codifican las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo monoclonal 22B5. La secuencia de ADN que codifica la secuencia de  $V_H$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 11. La secuencia de ADN que codifica la secuencia de  $V_L$  de 22B5 se muestra en la SEQ ID NO: 12.
- Una vez que se han obtenido los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante cualquier técnica adecuada de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub> está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante del anticuerpo o un conector flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en este contexto, se pretende que signifique que los dos fragmentos de ADN están unidos de un modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región V<sub>H</sub> se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa mediante unión operativa del ADN que codifica la V<sub>H</sub> a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de las regiones constantes de la cadena pesada humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publicación nº 913242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero, lo más preferiblemente, es una región constante de IgG1 o IgG4. La secuencia de la región constante de IgG1 puede ser cualquiera de los diferentes alelos o alotipos que se sabe que se encuentran entre individuos diferentes, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3) y Gm(17). Estos alotipos representan sustituciones de aminoácidos naturales en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V<sub>H</sub> se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V<sub>L</sub> se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica V<sub>L</sub> a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publicación nº 913242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican  $V_H$  y  $V_L$  se unen forma operativa a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub> -Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  se puedan expresar en forma de una proteína monocatenaria contigua, con las regiones  $V_L$  y  $V_H$  unidas mediante el conector flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348: 552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales de la descripción

10

25

30

45

50

55

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente descripción se pueden producir por una variedad de técnicas, incluyendo la metodología de anticuerpo monoclonal convencional, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495. También se pueden usar otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Las parejas de fusión (p. ej., células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente descripción se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito antes. El ADN que codifica la cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas se puede obtener del hibridoma murino de interés y genomanipular para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (p. ej., humanas) usando técnicas de biología molecular adecuadas. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, se pueden unir regiones variables murinas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en una región armazón humana usando métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 5.225.539 de Winter, y las patentes de EE.UU. nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

En algunos casos, los anticuerpos de la descripción son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra α5β1 se pueden generar usando ratones transgénicos o transcromosómicos portadores de partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos o transcromosómicos incluyen ratones denominados en la presente memoria ratón HuMAb® y ratón KM®, respectivamente, y en la presente memoria se denominan de forma colectiva "ratones con Ig humana".

El ratón HuMAb ® (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus de las cadenas μ y κ endógenas (véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan menor expresión de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas introducidos sufren cambio de clase y mutación somática para generar IgGκ monoclonal humana de alta afinidad (Lonbreg, N. et al. (1994, véase antes, revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación y uso del ratón HuMab® y las modificaciones genómicas que llevan dichos ratones se describen con más detalle en Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-3724; Choi et al.

(1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.*, 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) *J. Immunol.*, 152: 2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse también las patentes de EE.UU. números 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; patente de EE.UU. nº 5.545.807 de Surani et al.; publicaciones PCT Nº WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y publicación PCT nº WO 01/14424 de Korman et al.

En otro caso, los anticuerpos humanos de la descripción se pueden producir usando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que lleva un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en la presente memoria "ratones KM™", se describen con detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Aún más, los sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para producir anticuerpos anti-α5β1 de la presente descripción. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Además, los sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se puede usar para producir anticuerpos anti-α5β1 de la descripción. Por ejemplo, se pueden usar ratones que llevan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC", dichos ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727. Además, en la técnica se han descrito vacas que llevan transcromosomas de cadenas pesadas y ligeras humanas (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894) y se pueden usar para producir anticuerpos anti-α5β1 de la presente descripción.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la descripción también se pueden preparar usando procedimientos de presentación en fagos para la selección en genotecas de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; patentes de EE.UU. nº 5.427.908 y 5.580.717; de Dower et al.; patentes de EE.UU. nº 5.969.108 and 6.172.197 de McCafferty et al.; y patentes de EE.UU. nº 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

30 Los anticuerpos monoclonales humanos de la descripción también se pueden preparar usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de modo que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos tras inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.476.996 and 5.698.767 de Wilson et al.

Inmunización de ratones con Ig humana

10

15

20

50

55

Cuando se usan ratones con Ig humana para producir anticuerpos humanos de la descripción, dichos ratones se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida de antígeno α5β1 y/o α5β1 recombinante o una proteína de fusión de α5β1, como se describe en Lonberg, N. el al. (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y publicación PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (5-50 μg) del antígeno α5β1 para inmunizar los ratones con Ig humana por vía intraperitoneal. Además, se pueden usar fragmentos de polipéptidos de proteínas relevantes, p. ej., α5 y/o β1, para inmunizar los ratones. Por ejemplo, los fragmentos de polipéptidos se pueden conjugar con una molécula portadora para aumentar su inmunogenicidad. Dichas moléculas portadoras son bien conocidas en la técnica, e incluyen hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, tiroglobulina, toxoide de la difteria, y toxoide tetánico, entre otros.

En el Ejemplo 1 más adelante, se describen procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra  $\alpha 5\beta 1$ . La experiencia acumulada con varios antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando son inmunizados inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP en semanas alternas (hasta un total de 6) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, también se ha encontrado que son eficaces adyuvantes distintos de los de Freund. Además, se ha encontrado que las células enteras en ausencia de adyuvante son muy inmunógenas. La respuesta inmunitaria se puede seguir durante el curso del protocolo de inmunización, obteniéndose las muestras de plasma mediante extracciones de sangre retroorbitales. El plasma se puede someter a cribado mediante ELISA (como se describe más adelante) y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti- $\alpha 5\beta 1$  humana se pueden usar para las fusiones. Los ratones pueden recibir refuerzos por vía intravenosa con el antígeno 3 días antes del sacrificio y de la extracción del bazo. Se espera que pueda ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Típicamente se inmunizan entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Normalmente, se usan tanto cepas HCo7 como HCo12. Además, tanto los transgenes de HCo7 como de HCo12 se pueden introducir juntos en un único ratón que tiene dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). Alternativa o

adicionalmente, se puede usar la cepa de ratones KM™, como se describe en el Ejemplo 1.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

10

15

30

35

40

45

50

55

60

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la descripción, se pueden aislar esplenocitos y/o células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y se pueden fusionar con una línea celular inmortalizada adecuada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, las suspensiones celulares simples de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se pueden fusionar con un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Aq8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células se cultivan en placas con aproximadamente 2 x10<sup>5</sup> en placa de microvaloración de fondo plano, seguido de una incubación de 2 semanas en medio selectivo que contiene suero FetalClone al 20%, medio condicionado "654" al 18%, origen (IGEN) al 5%, Lglutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, penicilina 50 unidades/ml, estreptomicina 50 mg/ml, gentamicina 50 mg/ml y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente 2 semanas, las células se pueden cultivar en medio en el que el HAT se sustituye por HT. Los pocillos individuales se pueden someter a cribado por ELISA para anticuerpos IgG e IgM monoclonales humanos. Una vez producido un crecimiento extenso del hibridoma, el medio normalmente se puede observar tras 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se pueden volver a cultivar, cribar de nuevo y, si siguen siendo positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar al menos dos veces mediante dilución límite. Los subclones estables después se pueden cultivar in vitro para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados se pueden cultivar en matraces de agitación de dos litros para purificación de los anticuerpos monoclonales. Los líquidos sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con sefarosa-proteína A (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La lgG eluida se puede comprobar por electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento alto para garantizar la pureza. La disolución tampón se puede intercambiar en PBS y la concentración se puede determinar mediante DO280 usando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden separar en partes alícuotas y almacenar a -80°C.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la descripción también se pueden producir en un transfectoma de célula hospedante usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes, como es bien conocido en la técnica (p. ej., Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, se pueden obtener por técnicas de biología molecular convencionales (p. ej., amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma o fago que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN se pueden insertar en vectores de expresión de modo que los genes estén operativamente unidos a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, el término "operativamente unido" se pretende que signifique que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven para su función prevista de regulación de la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la expresión de la célula hospedante usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados, o más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por cualquier método adecuado (p. ej., unión de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen del anticuerpo y vector, o unión de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria, se pueden usar para crear genes de anticuerpo de longitud entera de cualquier isotipo de anticuerpo y subclase insertándolos en vectores de expresión que codifican las regiones constante de la cadena pesada y constante de la cadena ligera del isotipo y subclase deseados, de modo que el segmento V<sub>H</sub> se une operativamente al o a los segmentos C<sub>H</sub> dentro del vector, y el segmento V<sub>k</sub> se une operativamente al segmento C<sub>L</sub> dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula hospedante. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de modo que el péptido señal está unido en el marco al extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadenas de anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes de la descripción típicamente llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadenas de anticuerpos en una célula hospedante. La expresión "secuencia reguladora" se pretende que incluya promotores, protenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadneilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadenas de anticuerpos. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias

reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células hospedantes de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen niveles altos de expresión de proteínas en células de mamífero, tal como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de Simio 40, adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, se pueden usar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o promotor de β-globina. Además también, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de leucemia de linfocitos T humanos de tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de cadenas de anticuerpos y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la descripción pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedantes (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedantes en las que se ha introducido el vector (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedante en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células hospedantes dhfr- con selección con metotrexato/amplificación) y el gen neo (para la selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera son transfectados en una célula hospedante por cualquier técnica adecuada. Las diferentes formas del término "transfección" se pretende que abarquen una amplia variedad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una células hospedante procariota o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y similares. Aunque también se pueden expresar los anticuerpos de la descripción en células hospedantes procariotas, es más típica la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y típicamente en células hospedantes de mamífero.

Las células hospedantes de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen, por ejemplo, células de ovarios de hámster chino (CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable para DHFR, p. ej., como se describen R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, COS y células Sp2. En particular, para usar con células de mieloma NS0 o células CHO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión del gen de la GS (glutamina sintetasa) descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células hospedantes de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedantes durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedantes o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedantes. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando cualquier método de purificación de proteínas adecuado.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

20

25

30

35

40

45

50

55

Se puede ensayar la unión de los anticuerpos, o partes de unión al antígeno de los mismos, de la descripción, a α5ß1, por ejemplo, por ELISA convencional. Brevemente, se recubren placas de microvaloración con α5ß1 purificado 0,25 μg/ml en PBS, y después se bloquean con albúmina de suero bovino al 5% en PBS. Se añaden diluciones del anticuerpo (p. ej., diluciones de plasma de ratones inmunizados frente a α5ß1) a cada pocillo y se incuban durante 1-2 h a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con un reactivo secundario (p. ej., para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico de cabra anti-Fc de IgG humana) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 h a 37°C. Después de lavado las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml) y se analizan a la DO de 405-650. Preferiblemente, se usarán para las fusiones los ratones que desarrollen los títulos más altos.

También se puede usar un ensayo ELISA como se ha descrito antes para cribar hibridomas que muestran reactividad positiva con el inmunógeno α5β1. Los hibridomas que se unen con alta avidez a α5β1 se subclonan y se caracterizan más. Se puede elegir un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células originales (por ELISA), para hacer un banco de 5 a 10 viales de células almacenadas a -140°C, y para la purificación del anticuerpo.

Para purificar los anticuerpos anti-α5ß1, los hibridomas seleccionados se pueden cultivar en matraces de agitación de 2 litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los líquidos sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida se puede comprobar por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La disolución tampón se puede intercambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por la DO<sub>280</sub> usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en partes alícuotas y almacenar a -80°C.

Además, el epítopo unido por el anticuerpo se puede caracterizar por métodos convencionales conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen producir una matriz de fragmentos de péptidos que solapan de α5 y/o β1 y evaluar

la unión del anticuerpo a diferentes fragmentos. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones, p. ej., mutagénesis de barrido de alanina donde cada aminoácido se sustituye por un resto de alanina, en el péptido  $\alpha$ 5 y/o  $\alpha$ 1 y se puede comparar la unión del anticuerpo al péptido mutante con la unión del anticuerpo a la proteína natural, y de esta forma identificar sitios donde la o las mutaciones afectan a la unión. Véase, p. ej., Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-α5ß1 seleccionados o la parte de unión al antígeno de los mismos, se unen a epítopos únicos, cada anticuerpos se puede biotinilar usando reactivos disponibles en el comercio (Pierce, Rockford, IL). Se pueden llevar a cabo estudios de competición usando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados usando placas de ELISA recubiertas con α5ß1 como se ha descrito antes. La unión de los mAb biotiniliados se puede detectar con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se pueden llevar a cabo ELISA de isotipo usando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, se pueden recubrir pocillos de placas de microvaloración con anti-inmunoglobulina humana 1 µg/ml durante la noche a 4°C. Después de bloqueo con BSA al 1%, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de los anticuerpos monoclonales de ensayo o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Después, los pocillos se pueden hacer reaccionar con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas para IgG1 humana o IgM humana. Las placas se revelan y se analizan como se ha descrito antes.

Se puede ensayar además la reactividad de las IgG anti-α5ß1 humanas con el antígeno α5ß1 mediante transferencia Western. Brevemente, α5ß1 se puede preparar y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternero fetal al 10% y se tratan con sondas con los anticuerpos monoclonales que se van a ensayar. La unión de la IgG humana se puede detectar usando anti-IgG humana-fosfatasa alcalina y revelar con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

#### Inmunoconjugados

5

10

15

30

35

40

55

Un anticuerpo anti-α5ß1 de la invención se puede conjugar con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (p. ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados se denominan en la presente memoria "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células (p. ej., las mata). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracinodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol, y puromicina y análogo u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (e.g., vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo, o parte de unión al antígeno del mismo, de la descripción incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maytansinas y auristatinas, y derivados de los mismos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo y caliqueamicina está disponible en el comercio (Mylotarg<sup>Tm</sup>; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas se pueden conjugar con anticuerpos de la descripción, o partes de unión al antígeno de los mismos, usando diferentes tecnologías de conectores. Los ejemplos de tipos de conectores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y conectores que contienen péptidos. Se puede elegir un conector que, por ejemplo, sea susceptible a la escisión mediante pH bajo dentro del compartimiento lisosomal o que sea susceptible a la escisión por proteasas, tales como las proteasas expresadas de forma preferente en tejido tumoral tales como las catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para una discusión adicional sobre los tipos de citotoxinas, conectores y métodos para conjugar los agentes terapéuticos con los anticuerpos, véanse también Saito, G. et al., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al., (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne G., (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M., (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J., (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente descripción también se pueden conjugar a un isótopo radioactivo para generar sustancias radiofarmacéuticas citotóxicas, también conocidas como radioinmunoconjugados. Los ejemplos de los

isótopos radioactivos que se pueden conjugar con los anticuerpos para su uso para el diagnóstico o uso terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, itrio<sup>90</sup>, y lutecio<sup>177</sup>. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados están establecidos en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados que están disponibles en el comercio, incluyen Zevalin<sup>TM</sup> (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar<sup>TM</sup> (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpos se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y no se debe considerar el resto del fármaco limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxinas de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o el interferón-γ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a los anticuerpos son conocidas, véase, por ejemplo, et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academia Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", *Inmunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

## Moléculas biespecíficas

5

10

35

40

45

50

Las moléculas biespecíficas pueden comprender un anticuerpo anti-α5ß1 de la invención. Un anticuerpo de la invención se puede derivatizar o unir con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de la descripción de hecho se puede derivatizar o unir a más de una otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; dichas moléculas multiespecíficas también se pretende que estén englobadas por el término "molécula biespecífica" como se usa en la presente memoria. Para crear una molécula biespecífica de la descripción, un anticuerpo de la descripción se puede unir funcionalmente (p. ej., por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más de otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que resulte una molécula biespecífica.

Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos una primera especificidad de unión para α5ß1 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítopo diana. En un aspecto particular de la descripción, el segundo epítopo diana es un receptor de Fc, por ejemplo, FcγR1 humano (CD64) o un receptor de Fcγ humano (CD89). Por lo tanto, la descripción incluye moléculas biespecíficas que son capaces de unirse tanto a FcγR o células efectoras que expresan FcγR (p. ej, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)) como a células diana que expresan α5ß1. Estas moléculas biespecíficas dirigen las células que expresan α5ß1 a la célula efectora y producen actividades de la célula efectora mediadas por el receptor de Fc, tales como la fagocitosis de las células que expresan α5ß1, citotoxicidad mediada por las células dependientes de anticuerpo (ADCC), liberación de citoquinas, o generación de un anión superóxido.

La molécula biespecífica puede ser multiespecífica. La molécula además puede incluir una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-α5ß1. En un caso, la tercera especificidad de unión es una parte de anti-factor de potenciación (EF), p. ej., una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y de esta forma aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. La "parte anti-factor de potenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, p. ej., un antígeno o un receptor, y de esta forma da como resultado una potenciación del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o para el antígeno de la célula diana. La "parte anti-factor de potenciación" puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de la célula diana. Alternativamente, la parte anti-factor de potenciación se puede unir a una entidad que es diferente de la entidad a la cual se unen la primera y la segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la parte anti-factor de potenciación se puede unir a un linfocito T citotóxico (por ejemplo mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que produce una respuesta inmunitaria aumentada contra la célula diana).

En un caso, las moléculas biespecíficas de la descripción comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv o un Fv de cadena simple. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena simple como se describe en Ladner et al., patente de EE.UU, nº 4.946.778.

En un caso, la especificidad de unión para un receptor de Fcγ es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G humana (IgG). Como se usa en la presente memoria, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de 12 isoformas de receptor transmembrana o soluble que se agrupan en tres clases de receptores de Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). En un caso, el receptor de Fcγ es un FcγRI humano de alta afinidad. El FcγRI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad para la IgG monómera (10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>).

La producción y caracterización de determinados anticuerpos monoclonales anti-Fcγ la describen Fanger et al. en la Publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de EE.UU. nº 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítopo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fcγ del receptor y, por lo tanto, su unión no está sustancialmente bloqueada por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcγRI específicos útiles en esta descripción son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce el mAb 32 está disponible en la American Type Culture Collection, número de acceso en ATCC HB9469. En otros casos, el anticuerpo anti-receptor de Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graciano, R.F. et al., (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y la Publicación PCT WO 94/10332. La línea celular que produce el anticuerpo H22 fue depositada en la American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

10

15

20

25

30

60

En otros casos más, la especificidad de la unión para un receptor de Fc se proporciona mediante un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, p. ej., un receptor de Fc-alfa (FcαRI (CD89)), cuya unión típicamente no está bloqueada por la inmunoglobulina A humana (IgA). La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto del gen de un gen α (FcαRI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas de transmembrana empalmadas de forma alternativa de 55 a 110 kDa. El FcαRI (CD89) se expresa constitutivamente en los monocitos/macrófagos, los granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. El FcαRI tiene afinidad media (≈5 x 10<sup>7</sup> M⁻¹) tanto para la IgA1 como para la IgA2, que aumenta después de la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. et al., (1996) *Critical Reviews in Immunology* 116:423-440). Se han descrito 4 anticuerpos monoclonales específicos para FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a FcαRI fuera del dominio de unión del ligando IgA (Monteiro, R.C. et al., 1992 *J. Immunol.* 148:1764).

FcαRI y FcγRI son receptores activadores ilustrativos para usar en las moléculas biespecíficas de la descripción porque (1) son expresados principalmente en células efectoras inmunitarias, p. ej., monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) son expresados con altos niveles (p. ej., 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (p. ej., ADCC, fagocitosis); (4) median la presentación de antígeno potenciada de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos hacia ellos.

Las moléculas biespecíficas se pueden preparar conjugando las especificidades de unión de los constituyentes, p. ej., las especificidades de unión de anti-FcR y anti-α5ß1, usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar por separado y luego conjugar entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o de reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de los agentes de reticulación incluyen la proteína A, carbodiimida, tio-acetato de N-succinimidil-S-acetilo (SATA), 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), ofenilendimaleimida (oPDM), 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véanse por ejemplo, Karpovsky et al., (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 *Science* 229:81-83), y Glennie et al., (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375). Los agentes de conjugación adecuados incluyen SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlaces sulfhidrilo de la regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En un caso, la región bisagra se modifica para contener un número impar de restos sulfhidrilo, tal como un resto, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden ser codificadas en el mismo vector y expresadas y ensambladas en la misma célula hospedante. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la descripción puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la patente de EE.UU. nº 5.260.203; patente de EE.UU. nº 5.455.030; patente de EE.UU. nº 4.881.175; patente de EE.UU. nº 5.132.405; patente de EE.UU. nº 5.091.513; patente de EE.UU. nº 5.476.786; patente de EE.UU. nº 5.013.653; patente de EE.UU. nº 5.258.498; y patente de EE.UU. nº 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar, por ejemplo, por ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis por FACS, bioensayo (p. ej.,

inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular usando un reactivo marcado (p. ej., un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de FcR-anticuerpo se pueden detectar usando por ejemplo un anticuerpo ligado a una enzima o un fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar de forma radioactiva y usar en un radioinmunoensayo (RIA) (véase por ejemplo, Weintraub; B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o por autorradiografía.

# Composiciones farmacéuticas

5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de anticuerpos monoclonales de la presente descripción, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir una o una combinación de anticuerpos (p. ej., dos o más diferentes), o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas que comprenden anticuerpos de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la descripción puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-α5β1 de la presente descripción combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en terapia de combinación se describen con mayor detalle más adelante en la sección de usos de los anticuerpos de la descripción.

Como se usa en la presente memoria, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Típicamente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p. ej., por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, parte de unión al antígeno del mismo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente descripción pueden estar presentes en una forma neutra (incluyendo formas de ion híbrido) o como una especia con carga negativa o positiva. En algunos casos, los anticuerpos pueden formar complejo con un contraión para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, los compuestos farmacéuticos de la descripción pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original (p. ej., anticuerpo) y no imparte ningún efectos toxicológicos no deseados (véase p. ej., Berge, S.M., et al., (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Por ejemplo, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" incluye un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, donde los contraiones derivan de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y di-carboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxi-alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Además, las bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen iones metálicos. Los iones metálicos incluyen, pero no se limitan a sales de metales alcalinos adecuados, sales de metales alcalinotérreos y otros iones de metales fisiológicamente aceptables. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobalto, níquel, molibdeno, vanadio, manganeso, cromo, selenio, estaño, cobre, férrico, ferroso, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, potasio, rubidio, sodio y cinc, y sus valencias habituales.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los anticuerpos de la presente descripción se pueden preparar a partir de los siguientes ácidos, que incluyen, sin limitación, ácidos fórmico, acético, acetamidobenzoico, adípico, ascórbico, bórico, propiónico, benzoico, canfórico, carbónico, ciclámico, deshidrocólico, malónico, edético, etilsulfúrico, fendizoico, metafosfórico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, tánico, cítrico, nítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fólico, fumárico, propiónico, pirúvico, aspártico, glutámico,

benzoico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, lisina, isocítrico, trifluoroacético, pamoico, propiónico, antranílico, mesílico, orático, oxálico, oxalacético, oleico, esteárico, salicílico, aminosalicílico, silicato, p-hidroxibenzoico, nicotínico, fenilacético, mandélico, embónico, sulfónico, metanosulfónico, fosfórico, fosfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, amonio, bencenosulfónico, pantoténico, naftalenosulfónico, toluenosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, sulfúrico, nítrico, nitroso, éster monometílico del ácido sulfúrico, ciclohexilaminosulfónico, β-hidroxibutírico, glicina, glicilglicina, glutámico, cacodilato, diaminohexanoico, canforsulfónico, glucónico, tiociánico, oxoglutárico, piridoxal-5-fosfato, clorofenoxiacético, undecanoico, N-acetil-L-aspártico, galactárico y galacturónico.

5

35

40

55

60

Las bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen trimetilamina, dietilamina, N, N'-dibenciletilendiamina, 10 cloroprocaína, colina, dibencilamina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaína, aminas cíclicas, cationes de amonio cuaternario, arginina, betaína, cafeína, clemizol, 2-etilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanodiamina, butilamina, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, etilglucamina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, imidazol, isopropilamina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piridina, piridoxina, neodimio, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina, trietanolamina, trometamina, metilamina, taurina, colato, 6-amino-2-metil-2-heptanol, 2-15 amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxalcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, estroncio, tricina, hidrazina, fenilciclohexilamina, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, bis(2-hidroxietil)aminotris(hidroximetil)metano, ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico, ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico, ácido 20 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico, 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico, morfolinopropanosulfónico, 2-[(2-hidroxi-1,1bis(hidroximetil)etil)amino]etanosulfónico, N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico, ácido ácido 4-(Nmorfolino)butanosulfónico, ácido 3-(N,N-bis[2-hidroxietil]amino)-2-hidroxipropanosulfónico, ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico, 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-(2-hidroxipropanosulfónico piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxipropanosulfónico) dihidrato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfónico, 25 N,N-bis(2-hidroxietil)glicina, N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 4-butanosulfónico), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico, ácido N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanosulfónico, ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3amino-2-hidroxipropanosulfónico, ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1propanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico, ácido N-(2-acetamido)iminodiacético, ácido 4-30 (ciclohexilamino)-1-butanosulfónico, N-[tris(hidroximetil)metil]glicina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, y trometamol.

Una composición farmacéutica de la descripción también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloruro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de vehículos adecuados acuosos y no acuosos que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requerido en el caso de las dispersiones, y usando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Se puede asegurar la prevención de la presencia de microorganismos tanto por procedimientos de esterilización, véase antes, como por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser conveniente incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones.

Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede llevar a cabo por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de las disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Salvo en la medida en que sean incompatibles con el compuesto activo, se contempla el uso de cualquier medio o agente convencional en las composiciones farmacéuticas de la descripción. También se pueden incorporar en las composiciones los compuestos activos complementarios.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una disolución, microemulsión, liposoma, u otras estructuras ordenadas adecuadas para la concentración alta de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y

polietilenglicol líquido, y similares), y las mezclas convenientes de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Se puede lograr la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

5

10

25

30

55

60

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración para la esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen, pero no se limitan a secado a vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y del modo particular de administración. La cantidad del principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria en general será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, partiendo del cien por cien, esta cantidad estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 99 por ciento de principio activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento del principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma farmacéutica unitaria para la facilidad de administración y la uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas farmacéuticas unitarias de la descripción están dictadas por y dependen directamente de (a) las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de hacer compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal del hospedante. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación para un anticuerpo anti-α5ß1 o parte de unión al antígeno del mismo de la descripción incluyen, por ejemplo, 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal, por administración intravenosa, dando el anticuerpo usando una de los siguientes programas de dosificación: (i) cada 4 semanas durante 6 dosificaciones, después cada 3 meses; (ii) cada 3 semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo normalmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares indicados por la medición de los niveles en la sangre del anticuerpo contra el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos en el plasma de aproximadamente de 1 a 1000 μg/ml y en algunos métodos de aproximadamente de 25 a 300 μg/ml.

Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguido de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta en intervalos relativamente cortos hasta que el avance de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después, se puede administrar al paciente un

régimen profiláctico.

5

10

15

20

40

60

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, se pueden variar para así obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción usadas, o el éster, sal o amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se usa, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares usadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-α5ß1 de la presente descripción preferiblemente tiene como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de enfermedad, un aumento de la frecuencia y la duración de los periodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores positivos para α5ß1, una "dosificación terapéuticamente eficaz" preferiblemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente 80% respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir, tal como la inhibición in vitro mediante ensayos conocidos para el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o, de otro modo, mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades basadas en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o la vía de administración seleccionada.

Una composición de la presente descripción se puede administrar por una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para los anticuerpos o partes de unión al antígeno de los mismos de la descripción incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo por inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en la presente memoria, significa modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitaciones, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intracapsular, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo de la descripción se puede administrar mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protejan al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poligláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son conocidos en general para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

45 Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición terapéutica de la descripción se puede administrar con un dispositivo de invección hipodérmica sin aquia, tal como los dispositivos descritos en las patentes de EE.UU. nº 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente descripción incluyen: la patente de EE.ÚU. nº 4.487.603, que describe una bomba de 50 microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la patente de EE.UU. nº 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE.UU. nº 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión concreta; la patente de EE.UU. nº 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; la patente de EE.UU. nº 4.439.196, que describe un sistema 55 osmótico de suministro de fármaco que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente de EE.UU. nº 4.475.196, que describe un sistema osmótico de suministro de fármaco. Los expertos en la técnica conocen muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos.

En algún caso, los anticuerpos monoclonales humanos de la descripción se pueden formular para garantizar una distribución adecuada in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos muy hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la presente descripción atraviesan la BHE (si se

desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que son transportados de forma selectiva a células u órganos específicos, de modo que potencian el suministro de fármaco dirigido (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Los ejemplos de restos que dirigen incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais y col. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de la proteína A tensioactiva (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

### Usos v métodos de la descripción

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Los anticuerpos y composiciones de anticuerpos de la presente descripción tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas in vitro e in vivo que implican el diagnóstico y el tratamiento de trastornos mediados por  $\alpha 5 \beta 1$ . Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, in vitro o ex vivo, o a sujetos humanos, por ejemplo in vivo, para tratar, prevenir y diagnosticar una variedad de trastornos. Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se pretende que incluya animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad de la  $\alpha 5 \beta 1$ . Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la expresión aberrante de  $\alpha 5 \beta 1$ . Cuando los anticuerpos contra  $\alpha 5 \beta 1$  se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o de forma simultánea.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la descripción para  $\alpha$ 5%1, los anticuerpos de la descripción se pueden usar para detectar específicamente la expresión de  $\alpha$ 5%1 sobre la superficie de las células y, además, se puede usar para purificar  $\alpha$ 5%1 mediante purificación por inmunoafinidad.

Además, dada la expresión de α5β1 en diferentes células tumorales (véase, p. ej., el ejemplo 6, figura 7) y su implicación en la angiogénesis, los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente descripción se pueden usar para tratar un sujeto con crecimiento celular anormal, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan α5ß1 incluyen, por ejemplo, mesotelioma, hepatobiliar (hepático y el conducto biliar), un tumor del SNC primario o secundario, un tumor cerebral primario o secundario, cáncer de pulmón (CPCNP y CPCP), cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de la vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

En un caso, los anticuerpos (p. ej., moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) de la descripción, se pueden usar para detectar niveles de  $\alpha5\beta1$ , o niveles de células que contienen  $\alpha5\beta1$  en su superficie de membrana, cuyos niveles después se pueden conectar con determinados síntomas de enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos se pueden usar para inhibir o bloquear la función de  $\alpha5\beta1$  que, a su vez, se puede conectar con la prevención o mejora de determinados síntomas de enfermedad, implicando así la  $\alpha5\beta1$  como mediador de la enfermedad. Esto se puede lograr poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti- $\alpha5\beta1$  en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la  $\alpha5\beta1$ . Se detectan y comparan cualesquiera complejos formados entre el anticuerpo y  $\alpha5\beta1$  en la muestra y el control.

En otro caso, se puede ensayar inicialmente la actividad de unión de los anticuerpos (p. ej., moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) de la descripción, asociada con el uso terapéutico o de diagnóstico in vitro. Por ejemplo, las composiciones de la descripción se pueden ensayar usando los ensayos de citometría de flujo descritos en los ejemplos más adelante.

Los anticuerpos (p. ej., moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) de la descripción tienen utilidad adicional en la terapia y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la α5ß1. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunoconjugados se pueden usar para producir, in vivo o in vitro, una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento y/o matar una célula que expresa α5ß1; mediar la fagocitosis o la ADCC de una célula que expresa α5ß1 en presencia de células efectoras humanas, o bloquear la unión del ligando de α5ß1 a α5ß1.

En un caso particular, los anticuerpos (p. ej., moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) se usan in vivo para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con α5β1. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con α5β1 incluyen, entre otras, crecimiento celular anómalo, tal como el cáncer. En una realización, el crecimiento celular anómalo es el cáncer, incluyendo, pero no limitado a mesotelioma, hepatobiliar (hepático y el conducto biliar), un tumor del SNC primario o secundario, un tumor cerebral primario o secundario, cáncer de pulmón (CPCNP y CPCP), cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, gastrointestinal (gástrico, colorrectal y duodenal), cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkin, tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de la vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Las vías de administración adecuadas de las composiciones de anticuerpos (p. ej., moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la descripción, in vivo e in vitro, son bien conocidas en la técnica y las puede seleccionar el experto en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar por inyección (p. ej., intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto y de la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-α5ß1 humanos de la descripción se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos distintos, p. ej., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar asociado al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o simultáneamente con el agente o se puede coadministrar con otras terapias conocidas, p. ej., una terapia anticancerígena, p. ej., radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida, hidroxiurea que, por sí mismos, sólo son eficaces en niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se puede administrar por vía intravenosa como 100 mg/dosis una vez cada 4 semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos anti-α5ß1, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de la presente descripción con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que funcionan a través de diferentes mecanismos que dan un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las convertirían en no reactivas con el anticuerpo.

Las células efectoras específicas de la diana, p. ej., células efectoras asociadas con composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la descripción también se pueden usar como agentes terapéuticos. Las células efectoras para dirigir pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citolíticos naturales y otras células que llevan receptores de IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras se pueden obtener del sujeto que se va a tratar. Las células efectoras específicas de diana se pueden administrar en forma de una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de  $10^8$  a  $10^9$ , pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, p. ej., una célula tumoral que expresa  $\alpha5\Omega1$ , y para la muerte celular, p. ej., por fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de la diana se puede realizar junto con otras técnicas para la eliminación de células a las que está dirigida. Por ejemplo, la terapia antitumoral usando las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la presente descripción y/o las células efectoras armadas con estas composiciones, se pueden usar junto con quimioterapia. Adicionalmente, se puede usar inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos anti-α5β1 unidos a anti-Fc gamma RI o anti-CD3 se pueden usar junto con agentes de unión específicos de los receptores de IgG o IgA.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas, que comprenden anticuerpos de la presente descripción también se pueden usar para modular los niveles de FcγR o FcγR en células efectoras, tal como mediante tapado y eliminación de los receptores sobre la superficie celular. También se pueden usar para este propósito mezclas de anticuerpos anti-receptores de Fc.

Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la descripción que tienen sitios de unión al complemento, tal como partes de IgG1, -2 o -3 o IgM que se unen al complemento, también se pueden usar en presencia de complemento. En un

caso, el tratamiento ex vivo de una población de células que comprende las células diana con un agente de unión de la descripción y las células efectoras adecuadas se puede complementar mediante la adición del complemento o de suero que contiene complemento. La fagocitosis de células diana recubiertas con un agente de unión de la descripción se puede mejorar por unión de proteínas del complemento. En otro caso, las células diana recubiertas con las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la descripción también pueden ser lisadas por el complemento. En otro caso más, las composiciones de la descripción no activan el complemento.

Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la descripción también se pueden administrar junto con el complemento. Por consiguiente, dentro del alcance de la descripción están las composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas, y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas en cuanto que el complemento se localiza muy próximo a los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Alternativamente, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas de la descripción y el complemento o el suero se pueden administrar por separado.

10

40

45

50

55

Los kits pueden comprender las composiciones de anticuerpos de la descripción (p. ej., moléculas biespecíficas o multiespecíficas o inmunoconjugados) e instrucciones para usar. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanos adicionales o partes de unión al antígeno de los mismos, de la descripción (p. ej., un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítopo en el antígeno α5β1 distinto del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la descripción se pueden administrar adicionalmente (antes de, simultáneamente con, o tras la administración de un anticuerpo humano de la descripción) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

- En otros casos, el sujeto se puede tratar adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo potencia o inhibe, la expresión o la actividad de Fcγ o los receptores de Fcγ mediante, por ejemplo, tratamiento del sujeto con una citoquina. Las citoquinas para administrar durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón-γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).
- 30 Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la descripción también se pueden usar para dirigirlas a células que expresan FcγR o α5ß1, por ejemplo para marcar dichas células. Para dicho uso, el agente de unión se puede unir a una molécula que se puede detectar. Por tanto, la presente descripción proporciona procedimientos para localizar células ex vivo o in vitro que expresan receptores de Fc, tal como FcγR o α5ß1. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en métodos para detectar la presencia del antígeno  $\alpha 5 \Omega 1$  en una muestra, o medir la cantidad del antígeno  $\alpha 5 \Omega 1$ , que comprenden poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano, que se une específicamente a  $\alpha 5 \Omega 1$ , en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo y  $\alpha 5 \Omega 1$ . Después se detecta la formación de un complejo, en donde una formación de complejo diferente en la muestra comparado con la muestra de control indica la presencia del antígeno  $\alpha 5 \Omega 1$  en la muestra.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en métodos para tratar un trastorno mediado por  $\alpha5$ ß1 en un sujeto, por ejemplo, el crecimiento celular anómalo tal como el cáncer, administrando al sujeto los anticuerpos humanos o partes de unión al antígeno de los mismos, descritos antes. Dichos anticuerpos y derivados de los mismos se usan para inhibir las actividades inducidas por  $\alpha5$ ß1 asociadas con determinados trastornos, por ejemplo, angiogénesis, proliferación y diferenciación. Poniendo en contacto el anticuerpo con  $\alpha5$ ß1 (p. ej., administrando el anticuerpo a un sujeto), se inhibe la capacidad de  $\alpha5$ ß1 para inducir dichas actividades y, por lo tanto, se trata el trastorno asociado. La composición de anticuerpos se puede administrar sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico que actúa conjuntamente o de forma sinérgica con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir la enfermedad mediada por  $\alpha5$ ß1.

En otro caso más, los inmunoconjugados que comprenden anticuerpos de la descripción se pueden usar para dirigir compuestos (p. ej., agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen los receptores de  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 en la superficie celular, uniendo dichos compuestos al anticuerpo. Por lo tanto, la descripción también proporciona métodos para localizar células ex vivo o in vivo, que expresan  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (p. ej., con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático). Alternativamente, los inmunoconjugados se pueden usar para matar células que tienen receptores de superficie celular de  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas contra  $\alpha$ 5 $\beta$ 1.

La presente descripción se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse

como limitantes.

Los ejemplos se refieren a 4 tipos de anticuerpos, en concreto 22B5, 24C7, 1D9 y 2D2. Los anticuerpos 24C, 1D9 y 2D2 se incluye con propósitos de comparación y no forman parte de la invención.

#### Eiemplos

10

15

20

25

30

35

40

45

55

5 Ejemplo 1: Generación de un hibridoma que produce anticuerpo anti-α5ß1

Se prepararon, seleccionaron y ensayaron como sigue anticuerpos ilustrativos de acuerdo con la descripción:

Inmunización y generación de hibridoma:

Se usaron los siguientes inmunógenos para la generación de hibridoma: integrina-α5 proteína-Fc humana recombinante purificada; integrina-α5-His (R&D Systems, de encargo); células NIH3T3 transfectadas para expresar α5 humana; una línea celular Jurkat, una línea celular U-937 (nº de cat. ATCC CRL-1593) y una línea celular K-562 (nº de cat. ATCC CCL-243) que expresan de forma natural la integrina humana α5β1.

La integrina-α5 proteína-Fc humana recombinante es una construcción quimérica de un dominio extracelular de la integrina humana α5 (aminoácidos 42-995) fusionado con el dominio Fc de rata que se clonó en el vector pSecTag2 y se expresó usando el sistema 293-FreeStyle (Invitrogen). Las células NIH3T3 transfectadas para expresar α5 humana, se produjeron como sigue. Se clonó el ADNc de integrina α5 humana de longitud completa (Invitrogen, nº de cat. FL1002, ID de clon: 3629647) a partir del clon de la integrina α5 humana de longitud completa de la MGC (Invitrogen) y se subclonó en un vector de expresión de retrovirus (pBabe). Se generaron las partículas de virus y se usaron para infectar células NIH3T3 (nº de cat. ATCC CRL-1658). Se añadió puromicina para seleccionar los clones de células estables positivos. Se llevaron a cabo transferencia Western y análisis de FACS de la expresión de la proteína α5 humana para seleccionar los clones de células estables de expresión alta.

Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra la integrina humana α5ß1 se prepararon usando la cepa de ratón transgénico con Ig humana Hco7/Hco12 así como la cepa transcromosómica/transgénica para genes humanos, KM (Medarex, Inc.). Estas cepas expresan todas los anticuerpos totalmente humanos que son indistinguibles de los anticuerpos aislados de seres humanos. En estas cepas de ratón, el gen de la cadena ligera kappa endógeno de ratón se ha alterado de forma homocigótica como describen Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12:811-820 y el gen de la cadena pesada endógeno de ratón se ha alterado de forma homocigótica como se describe en el ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón lleva un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como describen Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. La cepa HCo7 lleva el transgén de la cadena pesada humana HCo7 como se describe en las patentes de EE.UU. 5.545.806, 5.625.825 y 5.545.807. La cepa HCo12 lleva el transgén de la cadena pesada humana HCo12 como se describe en el ejemplo 2 de la publicación PCT WO 01/09187. La cepa HCo7/HCo12 lleva los transgenes de la cadena pesada tanto HCo7 como HCo12. La cepa KM lleva un minicromosoma humano como describen Ishida et al., (2002), *Cloning and Stem Cells*, 4: 91-102.

Para generar los anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra α5ß1, se inmunizaron ratones HuMab de cepas Hco7/Hco12 y KM con integrina humana-α5 proteína-Fc o integrina-α5-His, células NIH3T3, transfectadas para expresar α5 humana, y la línea celular Jurkat, línea celular U-937 y línea celular K-562 que expresa de forma natural α5β1 humana. Los esquemas de inmunización generales para ratones HuMab se describen en Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada de antígeno integrina humana-α5 proteína-Fc o integrina-α5-His (15-20 μg), una preparación de células NIH3T3 transfectadas o células Jurkat, células U-937 y células K-562 (1 x 10<sup>7</sup> células) para inmunizar ratones HuMab por vía intraperitoneal (IP) y subcutánea (Sc).

Los ratones transgénicos se inmunizaron con el antígeno en adyuvante Ribi por vía intraperitoneal y subcutánea en intervalos de 1-4 semanas (hasta un total de 16 inmunizaciones). La respuesta inmunitaria se siguió en la sangre tomada de extracciones retroorbitales. El suero se cribó por FACS (como se describe más adelante), y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-α5β1 humana se usaron para las fusiones. Se llevó a cabo el refuerzo en los ratones por vía intravenosa con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y extracción del bazo y/o ganglios linfáticos. Típicamente, se llevaron a cabo 10-20 infusiones para cada antígeno. Se inmunizaron un total de 60 ratones Hc07/Hco12 y KM. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno.

50 Selección de ratones HuMab que producen anticuerpos anti-α5ß1:

Para seleccionar ratones HuMab que producen anticuerpos que se unen a  $\alpha5$ ß1, se cribaron los sueros de los ratones inmunizados por citometría de flujo (FACS) que se unían a una línea celular que expresaba  $\alpha5$ ß1 humana de longitud completa, y no a una línea celular de control que no expresaba  $\alpha5$ ß1. Brevemente, las células NIH3T3 que expresaban  $\alpha5$  se incubaron con suero de ratones inmunizados diluido hasta 1:20. Las células se lavaron y se detectó la unión específica del anticuerpo con anticuerpo anti-lgG humana marcado con FITC. Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo en un instrumento de citometría de flujo FACS (Becton Dickinson, San Jose,

CA). Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti- $\alpha$ 5ß1 se usaron para las fusiones. Las fusiones se llevaron a cabo como se describe más adelante y en los líquidos sobrenadantes de los hibridomas se ensayó la actividad anti- $\alpha$ 5ß1 por FACS.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra α5ß1:

- 5 Los esplenocitos y/o linfocitos de ganglios linfáticos de ratón, aislados de los ratones HuMab, se fusionaron usando electrofusión (E-fusion, Cyto Pulse™ technology, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) con la línea celular de mieloma de ratón, Sp2/0 (ATCC, CRL-1581, Manassas, VA), usando los protocolos recomendados por el fabricante. Brevemente, las suspensiones unicelulares de linfocitos esplénicos y/o de ganglios linfáticos de ratones inmunizados se fusionaron con un número igual de células de mieloma de ratón no secretoras Sp2/0 usando E-10 fusion. Las células se cultivaron en placa con aproximadamente 2x104 esplenocitos/pocillo en placas de microvaloración de fondo plano, y se incubaron durante 10 a 14 días en medio selectivo que contenía suero bovino fetal al 10%, medio condicionado P388D1 al 10% (ATCC, CRL-TIB-63), (IGEN) de 3 a 5% en DMEM (Mediatech, Herndon, VA, nº cat. CRL 10013), con alto contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato sódico), HEPES 5 mM, 2mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 mg/ml y 1x HAT (Sigma, nº cat. CRL-P-7185). Después de 1 a 2 semanas, las células se cultivaron en medio en el que el HAT se sustituyó por HT. Aproximadamente de 10 a 14 15 días después del cultivo celular, los líquidos sobrenadantes de los pocillos individuales se sometieron a cribado según contuvieran anticuerpos gamma, kappa humanos. Los líquidos sobrenadantes con puntuación positiva para anticuerpos gamma, kappa humanos posteriormente se cribaron por FACS (descrito antes) para el anticuerpo antiα5ß1 humano.
- 20 Anticuerpos IgG monoclonales:

25

30

45

Los hibridomas que secretaban anticuerpos se transfirieron a placas de 24 pocillos, se sometieron a selección de nuevo, y si se confirmaban positivos para los anticuerpos monoclonales IgG anti-α5β1 humana, se subclonaron al menos dos veces por dilución limitante. Después, los subclones estables se cultivaron in vitro para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en el medio de cultivo tisular para la posterior caracterización. Los procedimientos descritos antes se usaron para producir varios anticuerpos monoclonales anti-α5β1, incluyendo los anticuerpos denominados "22B5", "24C7", "1D9", y "2D2", que se describen en la presente memoria.

Ejemplo 2: Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales humanos 22B5

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 22B5 se obtuvieron del hibridoma 22B5 usando técnicas de PCR convencionales, y se secuenciaron usando técnicas de secuenciación de ADN convencionales.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 22B5 se muestran en las figuras 1A y 1B en las SEQ ID NO: 11 y 7, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 22B5 se muestran en las figuras 1C y 1D en las SEQ ID NO: 12 y 8, respectivamente.

- La subclase de la molécula 22B5 original era IgG4. La subclase de IgG se cambió a IgG1 para proporcionar unión a FcγR y funciones efectoras, tales como ADCC. Se introdujeron 3 mutaciones en la región constante de la IgG1 (S247D, A338L y I340E) por mutagénesis dirigida para aumentar más la unión a los FcγR y la actividad de función efectora. 22B5 con la subclase IgG1 y que contiene estas 3 mutaciones se denomina "22B5/DLE" o "22B5 IgG1 DLE". Dos mutaciones del dominio variable de la cadena pesada se devolvieron a la línea germinal para minimizar la inmunogenicidad (I30S y N33S). No se encontraron mutaciones en la secuencia variable de la cadena ligera. La cadena pesada de 22B5/DLE se muestra como SEQ ID NO: 9, mientras que la cadena ligera de 22B5/DLE se muestra como SEQ ID NO: 10.
  - La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina 22B5 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de 22B5 usa un segmento V<sub>H</sub> de la línea germinal humana V<sub>H</sub> 4-39, un segmento D de la línea germinal humana 3-10, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. El alineamiento de la secuencia de V<sub>H</sub> de 22B5 con la secuencia de V<sub>H</sub> 4-39 de la línea germinal se muestra en la figura 2. El análisis adicional de la secuencia de V<sub>H</sub> de 22B5 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestra en la figura 1B, y en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente.
- La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina 22B5 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de 22B5 usa un segmento V<sub>L</sub> de la línea germinal humana JK 4. El alineamiento de la secuencia de V<sub>L</sub> de 22B5 con la secuencia de la línea germinal VK L6 se muestra en la figura 2. El análisis adicional de la secuencia de V<sub>L</sub> de 22B5 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestra en la figura 1D, y en las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente.

Ejemplo 3: Caracterización de la especificidad de unión y cinética de unión del anticuerpo monoclonal humano 22B5

En este ejemplo, se examinaron la afinidad de unión y la cinética de unión del anticuerpo anti-α5ß1 humano con las mutaciones IgG1 DLE (22B5/DLE) por análisis de Biacore. También se examinó la especificidad de unión por citometría de flujo (FACS).

### Afinidad y cinética de unión

- La cinética de unión y la avidez nominal de 22B5/DLE frente al domino extracelular de α5β1 se determinó usando el análisis de Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Para llevar a cabo el análisis cinético de BIAcore, el anticuerpo 22B5/DLE se inmovilizó sobre un chip biosensor y se hicieron fluir a través de la superficie diferentes concentraciones del dominio extracelular de α5β1 recombinante humano, a 25,0°C (véase la figura 3). Los datos de unión se ajustaron globalmente a un modelo de unión uno a uno simple con línea base con desplazamiento.
   22B5/DLE se une de forma reversible a α5β1. La constante de unión (K<sub>D</sub>) al dominio extracelular de α5β1 recombinante humano estaba en el intervalo de 2,7 a 4,1 nM. La K<sub>D</sub> era mayor cuando se midió en ausencia de cationes divalentes, de acuerdo con la activación de la integrina dependiente de cationes. Los parámetros de unión cinéticos estaban en el intervalo de 3,4 x 10<sup>-5</sup> a 4,5 x 10<sup>-5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para la velocidad de formación, y de 1,2 x 10<sup>-3</sup> a 1,4 x 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> para la velocidad de disociación (véase la figura 3 y tabla 1).
- Para obtener una medición de la avidez nominal, el dominio extracelular de α5ß1 recombinante humano se inmovilizó en un chip biosensor y se hicieron fluir a través de la superficie diferentes concentraciones de 22B5/DLE a 25,0°C. Se calculó que un valor de avidez nominal era 0,05 pM en HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 al 0,005% con MqCl<sub>2</sub> 4,0 mM.

Tabla 1. Resumen de los datos de unión y cinética obtenidos de los estudios de BIAcore

Afinidad de 22B5/DLE por α5β1 (Biacore)	
K <sub>D</sub> (CaCl <sub>2</sub> )	2,7 nM
K <sub>D</sub> (MgCl <sub>2</sub> )	4,1 nM
Velocidad de formación (kon) (CaCl <sub>2</sub> )	4,5 x 10 <sup>-5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
Velocidad de formación (kon) (MgCl <sub>2</sub> )	3,4 x 10 <sup>-5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
Velocidad de disociación (k <sub>off</sub> ) (CaCl <sub>2</sub> )	1,2 x 10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup>
Velocidad de disociación (k <sub>off</sub> ) (MgCl <sub>2</sub> )	1,4 x 10 <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup>
Avidez de 22B5/DLE por α5β1 (K <sub>D</sub> , Biacore)	0,05 pM

20

40

 $CaCl_2$  se refiere a condiciones del tampón de HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 al 0,005% con  $CaCl_2$  4,0 mM;  $MgCl_2$  se refiere a condiciones del tampón de HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 al 0,005% con  $MgCl_2$  4,0 mM.

Determinación de la afinidad celular por α5ß1 por FACS

- Se ensayó la afinidad de unión del anticuerpo 22B5/DLE a la integrina α5 de superficie celular usando un ensayo de FACS, usando células que expresan la integrina α5ß1 humana endógena (HUVEC). Brevemente, las células se desprendieron usando tripsina-EDTA y se lavaron con PBS frío. Después de poner en partes alícuotas en placas de 96 pocillos, las células se bloquearon mediante suero y se incubaron con diferentes concentraciones de mAb específico durante 1 h a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-k humana conjugado con el fluoróforo R-PE y se analizaron por citometría de flujo con FACSCalibur. Se recogieron 10.000 sucesos para cada muestra sin aplicar ningún acotamiento de subgrupos. Para la determinación de K<sub>D</sub>, se calculó la media geométrica del histograma de cada muestra y se representó gráficamente en función de la concentración de mAb. Se calculó K<sub>D</sub> después del ajuste a un modelo de dos estados de equilibrio. 22B5/DLE se une a α5ß1 endógena con K<sub>D</sub> de 2,15 nM (n=4) en HUVEC (véase la figura 4).
- 35 Ejemplo 4: Afinidad para receptores de Fcγ por Biacore

La capacidad de 22B5/DLE, que contiene las tres mutaciones de IgG1 DLE (como se ha discutido previamente en el ejemplo 2), para potenciar la unión a los FcγR, se evaluó en un experimento de unión de Biacore. Las afinidades de unión a FcγR de 22B5/DLE se compararon con la afinidad de unión de la IgG1 natural (wt, "wild type"). Las tres clases de FcγR ensayadas eran: 1) el receptor de alta afinidad FcγRI; 2) las dos variantes polimórficas del receptor de baja afinidad FcγRIIa/131H y FcγRIIa/131R; y 3) las dos variantes polimórficas del receptor de afinidad media, FcγRIIIa/158F y FcγRIIIa/158V. Los resultados (mostrados en la figura 5, y resumidos en la tabla 2) muestran un aumento de aproximadamente 6 veces para el receptor de alta afinidad FcγRI. Se observó una potenciación de 122 y 70 veces para la unión al receptor de afinidad media FcγRIII/158F y 158V, respectivamente. La comparación de la

afinidad de unión de 22B5/DLE y la IgG1 natural también se evaluó frente a receptores Fcγ murinos. La mayor potenciación de la unión fue al mFcγRIV, seguido de FcγRI y FcγRIII (véase la figura 5).

Tabla 2: Unión de Biacore a FcyR (KD, número de veces de potenciación frente a la IgG1 wt)

FcγR	K <sub>D</sub> (número de veces de potenciación frente a la IgG1 wt)
FcγRI humano	5,8 nM (6 X)
FcγRIIa/131H humano	1000 nM (1,6 X)
FcγRIIa/131R humano	650 nM (2,3 X)
FcγRIII/158F humano	27 nM (122 X)
FcγRIII/158V humano	9,4 nM (70 X)
FcγRI murino	96 nM (14 X)
FcγRIII murino	1700 nM (5 X)
FcγRIV murino	9,1 nM (260 X)

## 5 Ejemplo 5: Actividad funcional celular de 22B5/DLE

Bloqueo de la adhesión celular

10

15

20

35

Se ensayó la capacidad de 22B5/DLE para interrumpir la adhesión celular mediada por la integrina α5β1. Los ensayos de adhesión celular se llevaron a cabo incubando previamente células HUVEC con un anticuerpo (22B5/DLE, variantes de subclase 22B5 IgG1, IgG2 e IgG4, o un mAb de control negativo (BHA2 IgG1)) y posteriormente se cultivaron en placas recubiertas con fibronectina (FN) o colágeno. Las células HUVEC (15.000) se mezclaron con anticuerpo en tampón de adhesión (disolución salina tamponada con Hepes que contenía glucosa y albúmina de suero bovino) durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se añadieron a los pocillos de la placa de 96 pocillos recubierta con fibronectina o colágeno, y se dejó que se adhirieran a la placa durante 1 h a 37°C/CO2 al 5%. Las células no adherentes se separaron lavando cada pocillo 3 veces. Se midió la cantidad de células adherentes que quedaban en cada pocillo. Las células adherentes se lisaron por adición de un tampón que contenía el colorante CyQUANT GR y se midió la fluorescencia a Ex/Em: 485/535 nm con un lector de placa. Como puede verse en la figura 6, los mAb que bloquean la función de la integrina α5ι31 inhiben selectivamente la adhesión de HUVEC a la fibronectina, pero no al colágeno (control negativo). Como se muestra en la figura 6, las Cl₅o para 22B5/DLE y sus variantes de subclases (IgG1 natural, IgG1 DLE, IgG2, e IgG4) eran similares para este ensayo de una hora. Estos datos demuestran que la unión del anticuerpo con α5 y/o α5β1 inhibe la unión de la integrina con la fibronectina. Estos datos indican además que el anticuerpo se une a α5β1 cuando es expresado en la superficie de las células. Es decir, el epítopo reconocido por el anticuerpo está disponible cuando las cadenas de α5 y ß1 están asociadas y el epítopo está disponible para la unión cuando la integrina es expresada en la superficie celular.

Ejemplo 6: Función efectora de ADCC in vitro

Las actividades de función efectora se evaluaron por ensayos de ADCC en presencia de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) contra células diana positivas para α5ß1 usando métodos convencionales. Los niveles de expresión de la integrina α5 a lo largo de una variedad de líneas celulares se midieron por análisis de transferencia Western, como sigue. Las células se lisaron en tampón de lisis RIPA (Upstate) que contenía proteasa (Roche) e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem). Los lisatos (3 μg de proteína total cada uno) se sometieron a electroforesis en gel de SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con anticuerpos anti-integrina α5. Se identificaron las bandas inmunorreactivas y se analizaron con el sistema de generación de imágenes por infrarrojo Odyssey de LI-COR Bioscience. Se muestra un ejemplo del intervalo de expresión en la figura 7.

Para medir la ADCC, las células efectoras (PBMC) se aislaron usando centrifugación por gradiente Ficoll de muestras del banco de sangre de San Diego, de acuerdo con métodos convencionales. Se incubaron previamente 10.000 células diana (HUVEC o líneas tumorales) con anticuerpo en medio de crecimiento a temperatura ambiente durante 20 min, después se añadieron 1 millón de PBMC humanas (E:T=100:1), y la mezcla se incubó a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5% durante 4 h. La lisis celular mediada por ADCC se midió usando la detección de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche) o el kit ToxiLight BioAssay (Cambrex), siguiendo protocolos convencionales.

22B5/DLE se une a la integrina α5ß1 expresada en tumor o endotelio y promueve la ADCC (hasta 80% de lisis de células diana) con una CE<sub>50</sub> de 0,04 nM comparado con 0,23 nM para 22B5 lgG1 wt. Estos datos indican que la mutación DLE potenciaba la actividad ADCC comparado con la lgG1 natural. No se observó ADCC para 22B5 lgG2 ni para 22B5 lgG4 en el ensayo de 4 horas. Se usó lgG1 KLH como un mAb de control negativo. Los ejemplos de

ADCC en HUVEC y una línea tumoral representativa (U87MG) se muestran en la figura 8 (representativos de ambos métodos de detección).

La citotoxicidad celular inducida por 22B5/DLE y 22B5 IgG1 wt se correlaciona con el nivel de expresión de α5ß1 por la línea celular, como se muestra por los datos proporcionados en la figura 9. Las células con la expresión más alta de α5ß1 (panel A, U87MG) demostraron el nivel más alto de toxicidad celular, mientras que las líneas celulares con expresión media (Figura 9, Hs578T y 3T3,a5) demostraron citotoxicidad intermedia. Hay que destacar que 22B5/DLE potenciaba los efectos de ADCC en células M24met, que expresaban un nivel bajo de α5β1 (ejemplos en el panel inferior de la figura 9). Estos datos demuestran que la ADCC es mediada, al menos en parte, por la unión del anticuerpo a α5ß1 expresada por la célula.

10 Ejemplo 7: Eficacia antimetástasis in vivo

5

20

25

40

50

Además de sus actividades de proproliferación, promigración y prosupervivencia en células endoteliales y tumorales, la integrina α5ß1 también está implicada en la metástasis tumoral al promover la extravasación de células tumorales y migración a órganos distantes. El siguiente estudio tiene por objetivo demostrar la eficacia antimetástasis de 22B5/DLE en un modelo preclínico.

15 Inhibición de metástasis experimental de A549-Luc al pulmón

A549-Luc es una línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano (CPCNP) transfectadas con el gen de la luciferasa. Cuando se implantan por vía intravenosa se localizan preferiblemente en el pulmón, el cual se puede medir por generación de imágenes de bioluminiscencia (BLI). En este estudio, se inyectaron células A549-Luc (3x10<sup>6</sup> por animal) por la vena de la cola en ratones BALB/c SCID que habían recibido una dosis previa del anticuerpo relevante dos días antes de la inyección. Después del implante, se administraron dosis a los animales una vez por semana hasta la semana 8. La bioluminiscencia de los animales individuales se midió una vez por semana hasta la semana 20.

22B5/DLE presentaba eficacia antimetástasis tumoral superior con una ICT (inhibición del crecimiento tumoral) de 97% la semana 8 (semana final de administración de dosis), que es estadísticamente significativa (p<0,01) comparada con el grupo de control. La administración de IgG2 22B5, que no se espera que medie la ADCC en este modelo, también logró una ICT significativo de 89% la semana 8 (figura 10A). Los p valores de la comparación entre 22B5/DLE y IgG2 22B5 las semanas 5, 6, 7 y 8 eran 0,07, 0,03, 0,08 y 0,17, respectivamente. Todos los tratamientos se detuvieron después de la semana 8, mientras que se continuaron el seguimiento diario de los signos fisiológicos adversos y las mediciones semanales por BLI de los animales.

Los tumores en el grupo tratado con 22B5/DLE siguieron suprimidos hasta la semana 13, mientras que los del grupo tratado con 22B5 IgG2 crecieron rápidamente aproximadamente 2 semanas después de interrumpir la administración de dosis (figura 10B). Se consideró que se había alcanzado el criterio de valoración del estudio cuando la BLI del tumor alcanzó 1x10<sup>8</sup> fotones/segundo, momento en el que lo ratones fueron sacrificados. La gráfica de Kaplan-Meier (figura 10C) muestra que 22B5/DLE prolongaba significativamente el tiempo de supervivencia de los animales a 20 semanas comparado con 14 semanas para los animales tratados con 22B5 IgG2 y 10 semanas para el grupo de control.

Estos datos demuestran que en este modelo, el efecto antitumoral de 22B5 no es mediado exclusivamente por la ADCC. Es decir, 22B5 lgG2 inhibía el crecimiento/invasión tumoral incluso aunque no se sepa que la lgG2 humana media funciones efectoras, incluyendo citotoxicidad celular, y también los efectos antitumorales mediados por anticuerpo. Además, los datos demuestran que el crecimiento del tumor seguía suprimido después de detener la administración de 22B5-lgG1-DLE. Estos datos muestran que el bloqueo de la unión de α5ß1 con la FN media un efecto antitumoral (22B5 lgG2) que además es potenciado por la ADCC (22B5-lgG1/DLE).

Ejemplo 8: caracterización estructural de los anticuerpos monoclonales humanos 24C7, 1D9 y 2D2

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 24C7, 1D9 y 2D2 se obtuvieron de los hibridomas 24C7, 1D9 y 2D2 (respectivamente) usando técnicas de PCR convencionales, y se secuenciaron usando técnicas de secuenciación de ADN convencionales.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 24C7 se muestran en las figuras 1E y 1F en las SEQ ID NO: 21 y 19, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 24C7 se muestran en las figuras 1G y 1H en las SEQ ID NO: 22 y 20, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1D9 se muestran en las figuras 1I y 1J en las SEQ ID NO: 31 y 29, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1D9 se muestran en las figuras 1K y 1L en las SEQ ID NO: 32 y 30, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2D2 se muestran en

las figuras 1M y 1N y en las SEQ ID NO: 41 y 39, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1D9 se muestran en las figuras 1O y 1P en las SEQ ID NO: 42 y 40, respectivamente.

La subclase de las moléculas 24C7, 1D9 y 2D2 originales era IgG1. Para la subclase de IgG1 se introdujeron 3 mutaciones en la región constante de IgG1 (S247D, A338L y I340E) por mutagénesis dirigida para aumentar más la unión a los FcγR y la actividad de función efectora. Por lo tanto, 24C7 con la subclase IgG1 y que contiene estas 3 mutaciones se denomina "24C7/DLE" o "24C7 IgG1 DLE". De forma similar, los anticuerpos análogos con estas 3 mutaciones se denominan en la presente memoria "1D9/DLE" o "1D9 IgG1 DLE", y "2D2/DLE" o "2D2 IgG1 DLE". De forma similar, los anticuerpos con las dos mutaciones S247D y I340E se denominan en la presente memoria mutantes "DE", p. ej. "24C7/DE", o "24C7 IgG1 DE". Se hace referencia de forma similar a denominaciones similares de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria y con cualquiera de 1, 2 ó 3 de las mutaciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, "1D9/DE" se refiere al anticuerpo 1D9 como se describe en la presente memoria, con una subclase IgG1 con las siguientes mutaciones en la región Fc - S247D y I340E. De forma similar, "2D2/L" se referiría al anticuerpo 2D2 como se describe en la presente memoria, con un isotipo IgG1 y que contiene la mutación A338L, etc.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina 24C7 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 24C7 usa un segmento V<sub>H</sub> de la línea germinal humana V<sub>H</sub> 3-30.3, un segmento D de la línea germinal humana 7-27, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6b. El análisis de la secuencia de V<sub>H</sub> de 24C7 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestra en la figura 1F, y en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina 24C7 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 24C7 usa un segmento  $V_L$  de la línea germinal humana VK L6, y un segmento JK de la línea germinal humana JK 2. El análisis de la secuencia de  $V_L$  de 24C7 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestra en la figura 1H, y en las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina 1D9 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 1D9 usa un segmento V<sub>H</sub> de la línea germinal humana V<sub>H</sub> 3-30.3, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6b. El segmento D no se podía asignar a un gen de la línea germinal debido a las mutaciones extensas. El análisis de la secuencia de V<sub>H</sub> de 1D9 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestra en la figura 1J, y en las SEQ ID NO: 23, 24 y 25. respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina 1D9 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 1D9 usa un segmento V<sub>L</sub> de la línea germinal humana VK L6, y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. El análisis de la secuencia de V<sub>L</sub> de 1D9 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestra en la figura 1L, y en las SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina 2D2 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 2D2 usa un segmento  $V_H$  de la línea germinal humana  $V_H$  3-30.3, un segmento D de la línea germinal humana 7-27, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6b. El análisis de la secuencia de  $V_H$  de 2D2 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestra en la figura 1N, y en las SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina 2D2 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 2D2 usa un segmento  $V_L$  de la línea germinal humana VK L6, y un segmento JK de la línea germinal humana JK 3. El análisis de la secuencia de  $V_L$  de 2D2 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la definición de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestra en la figura 1P, y en las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente. En la tabla 3 a continuación se muestra una tabla que muestra el uso de genes para los anticuerpos monoclonales 22B5, 2D2, 24C7 y 1D9.

Tabla 3: uso de genes

5

10

15

20

25

30

45

50

	Cadena pesada		Cadena ligera		
Anticuerpo	VH	D	JH	VK	JK

	Cadena pesada			Cadena ligera	
22B5	4-39	3-10	JH 6b	Vk L6	JK 4
2D2	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 3
24C7	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 2
1D9	3-30.3	No determinado	JH 6b	Vk L6	JK 1

Ejemplo 9: Caracterización de la especificidad de unión y cinética de unión de los anticuerpos monoclonales 22B5, 24C7, 1D9 y 2D2.

En este ejemplo se examinó la especificidad de unión de los anticuerpos anti-α5β1 humana 22B5, 24C7, 1D9 y 2D2 de subclase IgG1, con y sin las mutaciones IgG1 DLE (es decir, "22B5 G1 DLE", "22B5 G1", "1D9 G1 DLE", "1D9 G1" etc.) por citometría de fluio usando la separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Determinación de la afinidad celular por α5ß1 por FACS

5

10

15

25

30

45

Se ensayó la afinidad de unión de los anticuerpos 22B5/DLE, 24C7/DLE, 1D9/DLE y 2D2/DLE a la integrina α5 de superficie celular usando un ensayo de FACS, usando células que expresan la integrina α5ß1 humana endógena (HUVEC). Brevemente, las células se desprendieron usando tripsina-EDTA y se lavaron con PBS frío. Después de ditribuir en partes alícuotas en placas de 96 pocillos, las células se bloquearon por suero y se incubaron con diferentes concentraciones de mAb específico durante 1 h a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-k humana conjugado con el fluoróforo R-PE y se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCalibur. Se recogieron 10.000 sucesos para cada muestra sin aplicar ningún acotamiento de subgrupos. Para la determinación de K<sub>D</sub>, se calculó la media geométrica del histograma de cada muestra y se representó gráficamente en función de la concentración de mAb. Se calculó K<sub>D</sub> después del ajuste a un modelo de dos estados de equilibrio. Los resultados se muestran en las figuras 11A y 11B.

Ejemplo 10: Función efectora de la ADCC in vitro de anticuerpos monoclonales humanos 22B5, 24C7, 1D9 y 2D2.

Las actividades de función efectora se evaluaron por los ensayos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) como se ha descrito previamente en el ejemplo 6. Los valores de CE<sub>50</sub> para promover la ADCC (hasta 80% de lisis de células diana) en una línea tumoral representativa (U87MG) se muestran en la figura 12 para los anticuerpos 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE, y 24C7/DLE.

Ejemplo 11: Eficacia antitumoral dependiente de ADCC in vivo en un modelo singénico de melanoma metastásico

Para demostrar una respuesta específica de ADCC, se ensayó el anticuerpo monoclonal humano 1D9/DLE (que se une a α5ß1 humano y murino, pero no neutraliza funcionalmente α5ß1) en un modelo de inhibición de crecimiento tumoral (ICT) en ratones singénicos con células efectoras inmunitarias intactas. Específicamente, la actividad antitumoral mediada por ADCC se evaluó en un modelo de ratón singénico en el que las células B16F10 de melanoma murino expresaban α5ß1. La línea de melanoma de ratón B16F10 que expresa la integrina α5 es muy metastásica y coloniza principalmente el pulmón una vez inyectada por vía intravenosa. Las células tumorales se inyectaron por vía intravenosa en ratones C57BL/6 inmunocompetentes. Se inyectaron células B16F10 (2 x 10<sup>5</sup> por animal) por la vena de la cola en los ratones C57BL/6 hospedantes singénicos a los que se había administrado previamente anticuerpos (10 mg/kg, n=10 por grupo) 1 día antes de la inyección. Se administró anticuerpo a los animales por vía subcutánea una vez por semana durante un total de 3 semanas. Los animales se sacrificaron y los pulmones se extirparon el día 21.

Como se muestra mediante los resultados en la figura 13, el anticuerpo 1D9/DLE producía una eficacia antitumoral in vivo significativa indicando que una respuesta de ADCC sola es suficiente para producir ICT. Para definir el impacto específico de la ADCC en este modelo, los animales se trataron con 1D9 IgG2 (no se sabe que medie la ADCC) y 1D9 IgG1 DLE (isotipo IgG1 con potenciación de Fc en virtud de las mutaciones DLE). Se observó un efecto antitumoral mayor con 1D9 IgG1 DLE que con 1D9 IgG2. Debido a que las parejas de isotipos tienen secuencias de aminoácidos idénticas en el dominio de unión al antígeno y actividades in vitro, los datos muestran que la ADCC potenciada como resultado de las mutaciones DLE era responsable de la eficacia superior de 1D9 IgG1 DLE.

# Información de depósito

Los autores de la invención han depositado las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo denominado 22B5 en la presente memoria en la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA 20110-2209 U.S.A. La región VH de 22B5 se depositó el 16 de julio, 2008, y se le asignó el nº de depósito en ATCC PTA-9377. La región VL de 22B5 se depositó el 16 de julio, 2008, y se le asignó el nº de depósito en ATCC PTA-9377. Estos depósitos se hicieron bajo las normas del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del

Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y reglamentos del mismo (Tratado de Budapest). Estos depósitos se mantendrán sin restricción en el depósito de la ATCC durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la solicitud más reciente; o durante la validez de la patente, lo que sea más largo y se reemplazarán si los depósitos se vuelven no viables durante este periodo. La disponibilidad de los materiales depositados no debe interpretarse como una licencia para la práctica de cualquiera de los aspectos de la presente descripción, en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes. La memoria descriptiva escrita anterior se considera suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica todos los aspectos de la presente descripción. La presente descripción no está limitada en su alcance por los materiales depositados ya que la realización depositada pretende ser una sola ilustración de ciertos aspectos de la descripción y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta descripción. El depósito de material de la presente memoria no constituye una admisión de que la descripción escrita en la presente memoria es inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la descripción, incluyendo el mejor modo de la misma, ni es para ser interpretado como una limitación del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa.

15 Resumen de la lista de secuencias (a.a. = aminoácido; a.n. = ácido nucleico)

5

SEQ ID NO:	SECUENCIA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 22B5	23	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 1D9
2	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 22B5	24	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 1D9
3	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 22B5	25	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 1D9
4	V <sub>L</sub> CDR1 a.a. 22B5	26	V <sub>L</sub> CDR1 a.a. 1D9
5	V <sub>L</sub> CDR2 a.a. 22B5	27	V <sub>L</sub> CDR2 a.a. 1D9
6	V <sub>L</sub> CDR3 a.a. 22B5	28	V <sub>L</sub> CDR3 a.a. 1D9
7	V <sub>H</sub> a.a. 22B5	29	V <sub>H</sub> a.a. 1D9
8	V <sub>L</sub> a.a. 22B5	30	V <sub>L</sub> a.a. 1D9
9	Pesada a.a. 22B5/DLE	31	V <sub>H</sub> a.n. 1D9
10	Ligera a.a. 22B5	32	V <sub>L</sub> a.n. 1D9
11	V <sub>H</sub> a.n. 22B5		
12	V <sub>L</sub> a.n. 22B5	33	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 2D2
		34	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 2D2
13	V <sub>H</sub> CDR1 a.a. 24C7	35	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 2D2
24	V <sub>H</sub> CDR2 a.a. 24C7		
15	V <sub>H</sub> CDR3 a.a. 24C7	36	V <sub>L</sub> CDR1 a.a. 2D2
		37	V <sub>L</sub> CDR2 a.a. 2D2
16	V <sub>L</sub> CDR1 a.a. 24C7	38	V <sub>L</sub> CDR3 a.a. 2D2
17	V <sub>L</sub> CDR2 a.a. 24C7		
18	V <sub>L</sub> CDR3 a.a. 24C7	39	V <sub>H</sub> a.a. 2D2
		40	V <sub>L</sub> a.a. 2D2
19	V <sub>H</sub> a.a. 24C7	41	V <sub>H</sub> a.n. 2D2
20	V <sub>L</sub> a.a. 24C7	42	V <sub>L</sub> a.n. 2D2
21	V <sub>H</sub> a.n. 24C7	43	Regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 a.a. con mutaciones A247D, A338L, y I340E
22	V <sub>L</sub> a.n. 24C7	44	Región constante de la cadena ligera IgG1 a.a.

### **LISTA DE SECUENCIAS**

```
<110> Pfizer Inc and Medarex, Inc.
 5
     <120> Anticuerpos alfa 5-beta 1 y sus usos
     <130> PC33646
     <160> 44
10
     <170> PatentIn versión 3.4
     <210> 1
     <211>6
15
     <212> PRT
      <213> Humano
      <400> 1
      Ser Ser Ser Tyr Trp Gly
20
      <210> 2
      <211> 16
      <212> PRT
     <213> Humano
25
      <400> 2
      Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ser 10 15
     <210> 3
30
     <211> 15
     <212> PRT
     <213> Humano
      His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu Asp
1 10 15
35
      <210> 4
      <211> 11
      <212> PRT
40
     <213> Humano
      <400> 4
      Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 10
45
     <210> 5
     <211>7
      <212> PRT
      <213> Humano
50
      <400> 5
      Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
      <210>6
      <211>9
55
      <212> PRT
      <213> Humano
      <400>6
      Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr 1
```

```
<210> 7
<211> 125
<212> PRT
```

5 <213> Humano

<400> 7

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser 20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu 50 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115 120 125

10 <210> 8 <211> 107 <212> PRT <213> Humano

15 <400>8
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr 20 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 65 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu 95 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

5

<400>9
Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser 20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu 50 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 115 120 125

<sup>&</sup>lt;210> 9 <211> 455 <212> PRT <213> Humano

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 130 135 140 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 145 150 155 160 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 165 170 175 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 180 185 190 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 195 200 205 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu 210 220 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 225 230 235 240 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 245 250 255 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val 260 265 270 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 275 280 285 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 290 295 300 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 305 310 315 320 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 325 330 335 Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 340 345 350 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys 355 360 365 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 385 390 395 400

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser.Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 450 455

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

5

<213> Humano

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

	Lys Val Gla		Val Asp Asr 150	Ala Leu G 1	ln Ser Gly 55	Asn Ser Gln 160	
	Glu Ser Va	l Thr Glu ( 165	Sln Asp Ser	Lys Asp S 170	er Thr Tyr	Ser Leu Ser 175	
	Ser Thr Le	u Thr Leu ! 180	Ser Lys Ala	Asp Tyr G	lu Lys His	Lys Val Tyr 190	
	Ala Cys Glu 19		His Gln Gly 200		er Pro Val 205	Thr Lys Ser	
	Phe Asn Arg 210	g Gly Glu (	Cys				
5	<210> 11 <211> 375 <212> ADN <213> Humano						
	<400> 11 cagctgcagc	tgcaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcggagac	cctgtccctc	. 60
	acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcagc	agtagtagct	actggggctg	gatccgccag	120
	ccccaggga	aggggctgga	gtggattggg	agtatctact	atagtgggag	aaactacaac	180
	aacccgtccc	tcaagagtcg	agtcaccata	tccgtagaca	cgtccaagaa	ccagttctcc	240
	ctgaagctga	gctctgtgac	cgccgcagac	acggctgtgt	attactgtgc	gagacattac	300
	tatggttcgg	ggagttccta	ctactactac	gatctggacg	tctggggcca	agggaccacg	360
	gtcaccgtct	cctca					375
10	<210> 12 <211> 321 <212> ADN <213> Humano						
15	<400> 12 gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
	ctctcctgca	gggccagtca	gagtgttagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	120
	ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	180
	aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	240
	gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctctcac	tttcggcgga	300
	gggaccaagg	tggagatcaa	a				321
20	<210> 13 <211> 5 <212> PRT <213> Humano						
	<400> 13						

```
Ser Tyr Ala Met His 1
    <210> 14
    <211> 17
 5
    <212> PRT
    <213> Humano
     <400> 14
     Gly
10
    <210> 15
    <211> 12
     <212> PRT
    <213> Humano
15
    <400> 15
     Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
    <210> 16
20
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Humano
     <400> 16
     Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10
25
    <210> 17
    <211>7
    <212> PRT
30
    <213> Humano
    <400> 17
     Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
35
    <210> 18
    <211>9
     <212> PRT
    <213> Humano
40
    <400> 18
     Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr Thr 5
     <210> 19
    <211> 121
    <212> PRT
45
    <213> Humano
    <400> 19
```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

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

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

70 Fig.

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

95 Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

5

10

<213> Humano

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105

<210> 21

```
<211> 363
     <212> ADN
     <213> Humano
 5
     <400> 21
     caggtgcagt tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
                                                                                60
     tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgcta tgcactgggt ccgccaggct
                                                                               120
     ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcaa taaaaactac
                                                                               180
     gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
                                                                               240
     ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatgt attactgtgc gagagaatac
                                                                               300
     tggggaacct actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc
                                                                               360
     tca
                                                                               363
     <210> 22
     <211> 321
10
     <212> ADN
     <213> Humano
     <400> 22
                                                                                60
     gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
                                                                               120
     ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc aactacttag cctggtacca acagaaacct
                                                                               180
     ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
     aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
                                                                               240
     gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaccaact ggccgtacac ttttggccag
                                                                               300
     gggaccaagc tggagatcaa a
                                                                               321
15
     <210> 23
     <211>6
     <212> PRT
     <213> Humano
20
     <400> 23
     Ser Thr Tyr Ala Met His
     <210> 24
25
     <211> 17
     <212> PRT
     <213> Humano
     <400> 24
     Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 10 15
     Gly
30
     <210> 25
     <211> 14
     <212> PRT
35
     <213> Humano
     <400> 25
     Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
```

```
<210> 26
     <211> 10
     <212> PRT
 5
     <213> Humano
     <400> 26
     Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu
1 5 10
     <210> 27
10
     <211>7
     <212> PRT
     <213> Humano
15
     <400> 27
     Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
     <210> 28
     <211> 9
20
     <212> PRT
     <213> Humano
     <400> 28
     Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
5
25
     <210> 29
     <211> 122
     <212> PRT
     <213> Humano
30
     <400> 29
      Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 10 15
      Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Thr Tyr 20 25 30
      Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
      Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 60
      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
     Ala Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110
     Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
```

<210> 30

	<211> 107 <212> PRT <213> Humano	
5	<400>30 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15	
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr 20 25 30	
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45	
	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 65 70 75 80	
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg	
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105	
10	<210> 31 <211> 366 <212> ADN <213> Humano	
15	<400>31 caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60	ļ
	tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt acctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120	t
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180	
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240	
	ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagtcc 300	
	cccccatct actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360	
	tcctca 366	
20	<210> 32 <211> 321 <212> ADN <213> Humano	
	<400>32 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 1	20
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 1	в0
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 2	40
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 3	00
05	gggaccaagg tggaaatcaa a 32	21
25	<210> 33	

```
<211> 5
      <212> PRT
      <213> Humano
      <400> 33
      Ser Tyr Ala Met His
1 5
      <210> 34
      <211> 17
      <212> PRT
10
      <213> Humano
      <400> 34
      val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys 1 \phantom{\bigg|}10\phantom{\bigg|}
      Gly
15
      <210> 35
      <211> 12
      <212> PRT
      <213> Humano
20
      Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val 1 	 5
      <210> 36
25
      <211> 11
      <212> PRT
      <213> Humano
      Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
30
      <210> 37
      <211>7
      <212> PRT
      <213> Humano
35
      <400> 37
      Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
40
      <210> 38
      <211>9
      <212> PRT
      <213> Humano
45
      <400> 38
      Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
      <210>39
      <211> 121
      <212> PRT
50
      <213> Humano
      <400> 39
```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Sor Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asp Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ileu Arg Ala Ser Ser Ileu Arg Ala Arg Gly Thr Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser

<210> 40 <211> 107

<212> PRT

<213> Humano

<400> 40

10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1. 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5	<210> 41 <211> 363 <212> ADN <213> Humano	
5	<400>41 caggtgcaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcac taaatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctggat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctctgt attactgtgc gagagaatac	300
	tggggaacct actactacgg gacggacgtc tggggccaag ggaccacggt catcgtctcc	360
	tca	363
10	<210> 42 <211> 321 <212> ADN <213> Humano	
	<400>42 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttaac agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa	300
15	gggaccaagg tggaaatcaa a	321
20	<210> 43 <211> 330 <212> PRT <213> Humano	
	<400>43 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys 1 10 15	
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30	

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 60 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro 115 120 125 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 130 135 140 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 145 150 155 160 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asm Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 165 170 175 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205 Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu 225 230 235 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325 330

<210> 44

<211> 107

5

<212> PRT

<213> Humano

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

#### **REIVINDICACIONES**

- 1.- Un anticuerpo monoclonal aislado capaz de unirse a la integrina α5ιβ1 que comprende:
  - (a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 1;
  - (b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 2;
  - (c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 3;
  - (d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 4;
  - (e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 5; y
  - (f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6.
- 2.- El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende

5

15

- 10 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y
  - (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
  - 3.- El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa, y en donde al menos un aminoácido en la región Fc de dicho anticuerpo está mutado, y además en donde dicho anticuerpo presenta mayor ADCC que un anticuerpo idéntico en donde dicho al menos un aminoácido no está mutado.
  - 4.- El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde la al menos una mutación se produce en la posición del aminoácido serina 247, alanina 338 o isoleucina 340.
  - 5.- El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde la al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en de serina 247 a ácido aspártico (S247D), de alanina 338 a leucina (A338L), y de isoleucina 340 a ácido glutámico (I340E).
  - 6.- El anticuerpo de la reivindicación 5, donde el anticuerpo comprende las mutaciones S247D, A338L, y I340E.
  - 7.- Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 8.- Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada y ligera de los anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
  - 9.- Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.
  - 10.- Una célula hospedante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
  - 11.- Un método para preparar un anticuerpo anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 que comprende expresar el anticuerpo en la célula hospedante de la reivindicación 10.
- 30 12.- El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición de la reivindicación 7 para usar en la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan la integrina α5β1.

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC
CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGCT
ACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
AGTATCTACTATAGTGGGAGAAACTACAACAACCCGTCCCTCAAGAGTCG
AGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
GCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACATTAC
TATGGTTCGGGGAGTTCCTACTACTACTACTACGATCTGGACGTC
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figura 1A: secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 22B5 (SEQ ID NO: 11)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS<u>SSSYWG</u>WIRQPPGKGLEWIG<u>SIYYSG</u> <u>RNYNNPSLKS</u>RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR<u>HYYGSGSSYYYY</u> DLDVWGQGTTVTVSS

Figura 1B: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 22B5 (SEQ ID NO: 7)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAT
GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTG
CAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Figura 1C: secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 22B5 (SEQ ID NO: 12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQSVSSYLA</u>WYQQKPGQAPRLLIY<u>DASNRA</u> TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC<u>QQRSNWPLT</u>FGGGTKVEIK

Figura 1D: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 22B5 (SEQ ID NO: 8)

Figura 1E: secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 24C7 (SEQ ID NO: 21)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS<u>SYAMH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>VISF</u> <u>DGSNKNYADSVKG</u>RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAR<u>EYWGTYY</u> <u>YGMDV</u>WGQGTTVTVSS

Figura 1F: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 24C7 (SEQ ID NO: 19)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTACCAACTGGCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA
GATCAAA

Figura 1G: secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 24C7 (SEQ ID NO: 22)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQSVSNYLA</u>WYQQKPGQAPRLLIY<u>DASNRA</u> TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRTNWPYTFGQGTKLEIK

Figura 1H: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 24C7 (SEQ ID NO: 20)

Figura 11: secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 1D9 (SEQ ID NO: 31)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPF<u>STYAMH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>VISY</u> <u>DGSNKYYADSVKG</u>RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA<u>RESPPIYYYY</u> <u>GMDV</u>WGQGTTVTVSS

Figura 1J: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1D9 [SEQ ID NO: 29]

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAA

Figura 1K: secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 1D9 (SEQ ID NO: 32)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQSVSSYLA</u>WYQQKPGQAPRLLIY<u>DASNRA</u>TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC<u>QQRSNWPRT</u>FGQGTKVEIK

Figura 1L: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1D9 (SEQ ID NO: 30)

Figura 1M: secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada de 2D2 (SEQ ID NO: 41)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS<u>SYAMH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>VISF</u> <u>DGSTKYYADSVKG</u>RFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTALYYCAR<u>EYWGTYYY</u> <u>GTDV</u>WGQGTTVIVSS

Figura 1N: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2D2 (SEQ ID NO: 39)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAACAGCTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAA

Figura 10: secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera de 2D2 (SEQ ID NO: 42)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQSVNSYLA</u>WYQQKPGQAPRLLIY<u>DASNRA</u>TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC<u>QQRSNWPRT</u>FGQGTKVEIK

Figura 1P: secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2D2 (SEQ ID NO: 40)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

Figura 1Q: secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1 con mutaciones S247D, A338L y I340E en negrilla y subrayado (SEQ ID NO: 43)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 1R: secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de IgG1 (SEQ ID NO: 44)

# $\mathbf{V}_{\mathbf{H}}$

22b5	Línea germinal I30S N33S	QLQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWG WIRQPPGKGLEWI
22b5	Línea germinal I30S N33S	GSIYYSG STYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
22b5	Línea germinal I30S N33S	QYYYGSG SYYNYYYYGMDV WGQGTTVTVSS H
V <sub>K</sub>		
	Línea germinal I30S N33S	EIVLTQSPA TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
22b5	•	EIVLTQSPA TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGG

# Figura 2

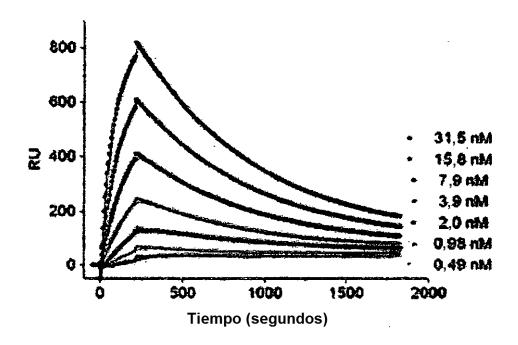


Figura 3

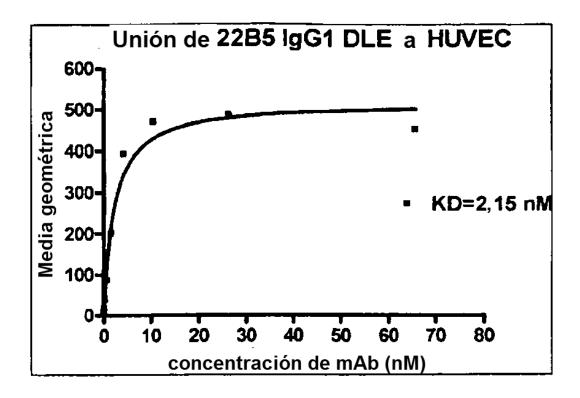


Figura 4

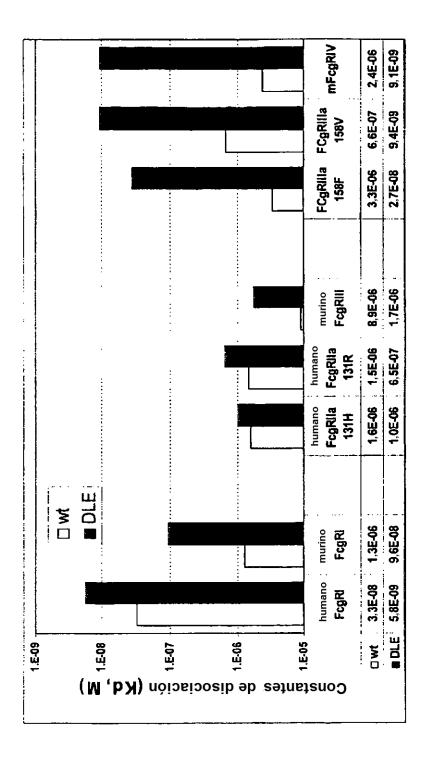


Figura 5

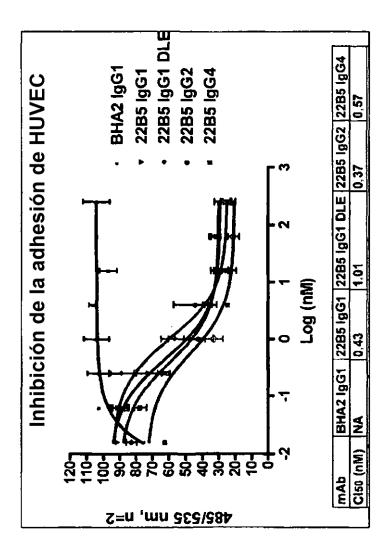


Figura 6

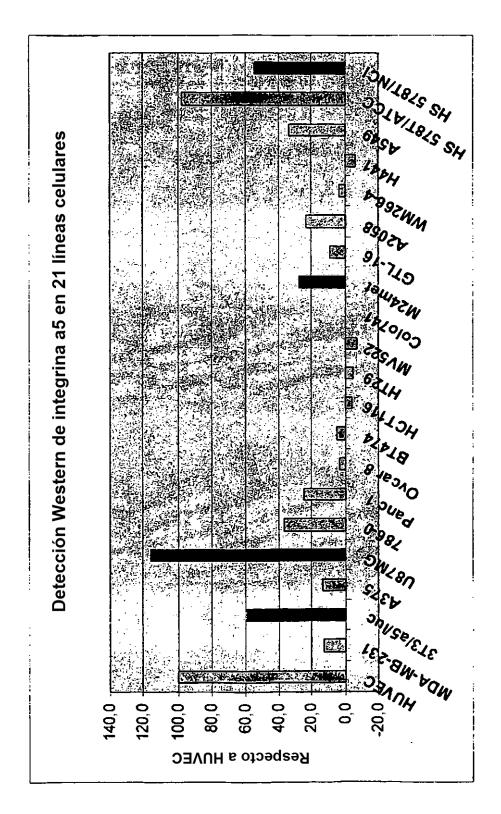


Figura 7

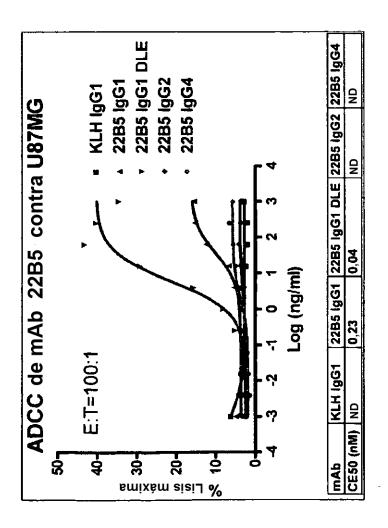


Figura 8A

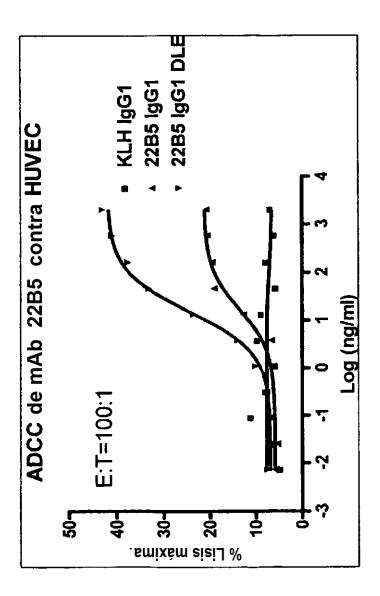


Figura 8B

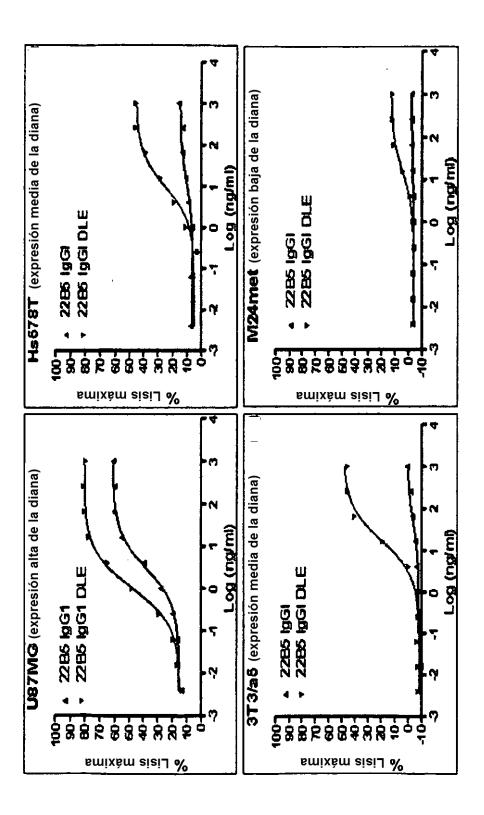
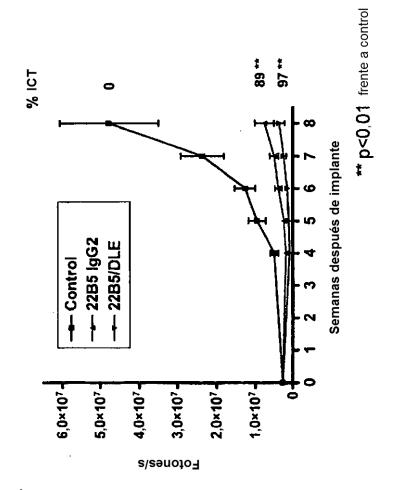
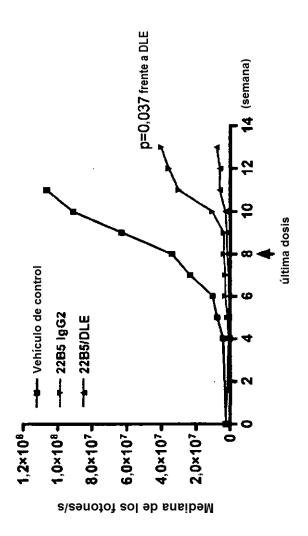


Figura 9

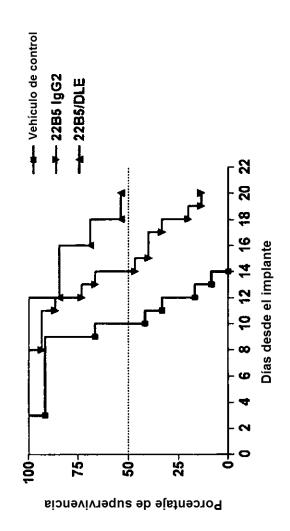


70



 $\mathbf{\omega}$ 

Figura 10B

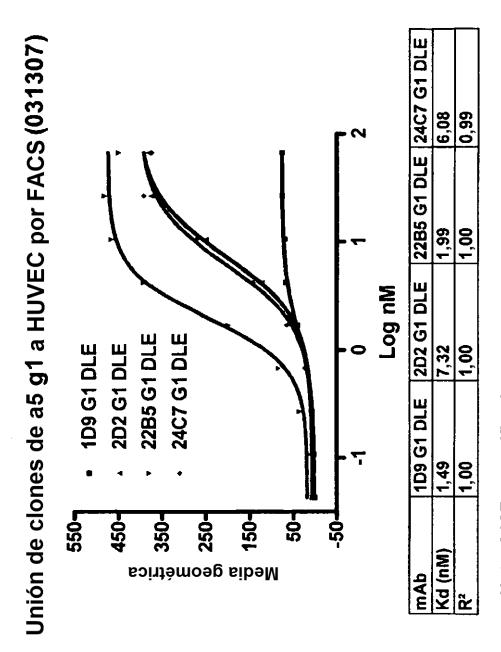


ပ

Figura 10C

Unión de clones de a5 a HUVEC por FACS (030207) 109 G1 109 G1 DLE 202 G1 DLE 2285 G1 2285 G1 DLE 2,42 1,00 1,95 0,99 Log nM 8,78 0,99 22B5 G1 DLE 109 G1 DLE 2D2 G1 DLE 22B5 G1 1D9 G1 1,68 Kd (nM) 1,69 1,00 7507 250mAb Media geométrica

Figura 11A



Nota: 24C7 no purificado

Figura 11B

22B5/G1/DLE 24C7/G1/DLE 109/G1/DLE 2D2/G1/DLE 22B5/G1/DLE 24C7/G1/DLE 1 1D9/G1/DLE 2D2/G1/DLE - 1D9/G1 ADCC de clones a5/g1 contra U87MG (030707) 1,21 Log (ng/ml) 1D9/G1 901 30-င္တ် % Lisis máxima

2,28 0,99 2,66 0,96 0,99 CE50 (ng/ml) 5,06

nota: 24C7 no purificado

Figura 12

Figura 13 ⊿

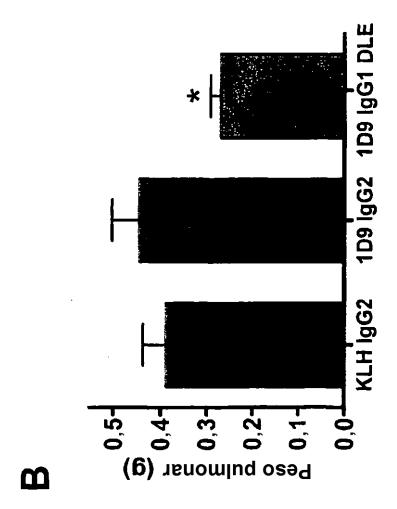


Figura 13 B

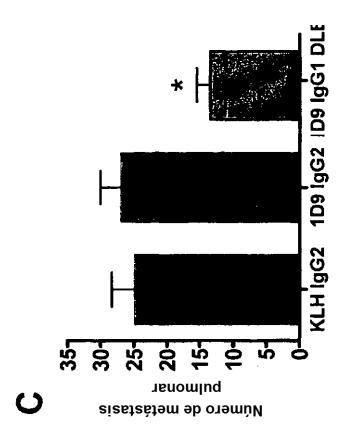


Figura 13 C