

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 517**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2007 E 07758256 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 1994055**

54 Título: **Anticuerpos anti-5T4 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**10.03.2006 US 781346 P**  
**23.02.2007 US 891248 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.09.2014**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)**  
**235 East 42nd Street**  
**New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**BOGHAERT, ERWIN R.;**  
**DAMLE, NITIN K.;**  
**HAMANN, PHILIP ROSS;**  
**KHANDKE, KIRAN;**  
**KUNZ, ARTHUR;**  
**MARQUETTE, KIMBERLY A.;**  
**TCHISTIAKOVA, LIUDMILA;**  
**GILL, DAVINDER y**  
**SREEKUMAR, KODANGATTIL RAMAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 498 517 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-5T4 y usos de los mismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere en general a anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco (es decir, inmunoconjugados) para el diagnóstico y/o tratamiento de trastornos neoplásicos o malignos. La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos de región variable aislados y polipéptidos para preparar anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco.

**Antecedentes de la invención**

10 La disponibilidad de anticuerpos monoclonales de alta afinidad ha permitido el desarrollo de inmunoterapias dirigidas. De acuerdo con este enfoque, un agente terapéutico se acopla con un anticuerpo con especificidad de unión para una población celular diana definida. Los agentes terapéuticos que se han conjugado con anticuerpos monoclonales incluyen citotoxinas, modificadores de la respuesta biológica, enzimas (por ejemplo, ribonucleasas), proteínas y péptidos inductores de apoptosis, y radioisótopos. Los conjugados de anticuerpo/citotoxina se denominan generalmente inmunocitotoxinas. Los anticuerpos acoplados con fármacos de bajo peso molecular tales como metotrexato se denominan típicamente conjugados de quimioanticuerpo/fármaco. Los conjugados descritos como inmunomoduladores contienen modificadores de la respuesta biológica tales como linfocinas, factores de crecimiento y factor de veneno de cobra activador del complemento (CVF). Los anticuerpos radiomarcados incluyen isótopos radiactivos que pueden usarse para radioterapia así como captura de imágenes.

20 La administración de fármacos mediado por anticuerpos a células tumorales aumenta la eficacia del fármaco minimizando su captación en tejidos normales. Véase, por ejemplo, Reff y col. (2002) Cancer Control 9:152-66; Sievers (2000) Cancer Chemother. Pharmacol. 46 Supl: S18-22; Goldenberg (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39:195-201. MYLOTARG® (ozagamicina de gemtuzumab) es una inmunoterapia dirigida disponible en el mercado que actúa de acuerdo con este principio y que está aprobada para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda en pacientes ancianos. Véase Sievers y col. (1999) Blood 93: 3678-84. En este caso, la molécula de dirección es un anticuerpo monoclonal anti-CD33 que está conjugado con caliqueamicina.

30 La inmunoterapia dirigida en seres humanos se ha limitado no obstante, en parte debido a respuestas adversas a anticuerpos monoclonales no humanos. Los ensayos clínicos tempranos usando anticuerpos de roedor revelaron respuestas de anticuerpo humano anti ratón (HAMA) y anticuerpo humano anti rata (HARA), que dan como resultado eliminación de anticuerpos rápida. Se han desarrollado desde entonces anticuerpos menos inmunogénicos, incluyendo anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos PRIMATIZED® y anticuerpos humanos preparados usando ratones transgénicos o bibliotecas de presentación de fagos. Véase Morrison y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-5; Queen y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-33; Newman y col. (1992) Biotechnology (NY) 10:1455-60; Green y col. (1994) Nat. Genet. 7:13-21; Marks y col. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97. La evitación de una respuesta HAMA permite la administración de dosis alta y dosis repetida para conseguir una respuesta terapéutica.

40 Los anticuerpos candidatos para dirección farmacológica incluyen anticuerpos que reconocen antígenos oncofetales, es decir, antígenos presentes en células fetales y células neoplásicas, y que están en gran medida ausentes de células adultas normales. Véase, por ejemplo, Magdelenat (1992) J. Immunol. Methods 150: 133-43. El antígeno oncofetal 5T4 es una glicoproteína transmembrana altamente glucosilada de 72 kDa que comprende un núcleo no glucosilado de 42 kDa (Hole y col. (1988) Br. J. Cancer 57: 239-46, Hole y col. (1990) Int. J. Cancer 45: 179-84; Publicación internacional de PCT N° WO89/07947; Patente de E.E.U.U N° 5.869.053). 5T4 incluye un dominio extracelular caracterizado por dos repeticiones ricas en leucina (LRR) y una región hidrófila intermedia, que es un sitio accesible para terapia dirigida (Myers y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 9319-24).

45 El 5T4 humano se expresa en numerosos tipos de cáncer, incluyendo carcinomas de la vejiga, mama, cuello uterino, endometrio, pulmón, esófago, ovario, páncreas, estómago y testículo, y esta sustancialmente ausente de tejidos normales, excepto por el sincitiotrofoblasto en la placenta (véase, por ejemplo Southall y col. (1990) Br. J. Cancer 61: 89-95 (immunohistological distribution of 5T4 antigen in normal and malignant tissues); Mieke y col. (1997) Clin. Cancer Res. 3: 1923-1930 (low intercellular adhesion molecule 1 and high 5T4 expression on tumor cells correlate with reduced disease-free survival in colorectal carcinoma patients); Starzynska y col. (1994) Br. J. Cancer 69: 899-902 (prognostic significance of 5T4 oncofetal antigen expression in colorectal carcinoma); Starzynska y col. (1992) Br. J. Cancer 66: 867-869 (expression of 5T4 antigen in colorectal and gastric carcinoma); Jones y col. (1990) Br. J. Cancer 61: 96-100 (expression of 5T4 antigen in cervical cancer); Connor y Stem (199) Int. J. Cancer 46: 1029-1034 (loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas); Ali y col. (2001) Oral Oncology 37: 57-64 (pattern of expression of the 5T4 oncofetal antigen on normal, dysplastic and malignant oral mucosa); Publicación internacional de PCT N° WO89/07947; Patente de E.E.U.U. N° 5.869.053). Por ejemplo, los tejidos que se ha indicado que no tienen expresión de 5T4 incluyen el hígado, piel, bazo, timo, sistema nervioso central (SNC), glándula adrenal y ovario. Los tejidos que se han indicado que tienen expresión focal o baja de 5T4 incluyen el hígado, piel, bazo, ganglio linfático, amígdala, tiroides, próstata y vesículas seminales. Se ha indicado expresión difusa débil-moderada

de 5T4 en el riñón, pulmón, páncreas, faringe y tracto gastrointestinal. El único tejido que se ha indicado que tiene alta expresión de 5T4 es el sincitiotrofoblasto; 5T4 también estaba ausente de suero normal o el suero de mujeres embarazadas (es decir niveles < 10 ng/ml). La sobreexpresión de 5T4 en tumores se ha correlacionado con progresión de enfermedad, y se ha sugerido que la evaluación de la expresión de 5T4 es un enfoque útil para identificar pacientes con pronóstico a corto plazo (Mulder y col. (1997) Clin. Cancer Res. 3: 1923-30, Naganuma y col. (2002) Anticancer Res. 22: 1033-1038, Starzynska y col. (1994) Br. J. Cancer 69: 899-902, Starzynska y col. (1998) Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 10: 479-484, Wrigley y col. (1995) Int J. Gynecol. Cancer 5: 269-274).

Se han descrito varios anticuerpos anti 5T4, incluyendo mAb5T4, también denominado el anticuerpo H8 que reconoce un epítipo conformacional del antígeno 5T4 (Shaw y col. (2002) Biochem. J. 363: 137-45, Publicación Internacional de PCT N° WO98/55607), un anticuerpo monoclonal de rata (Woods y col. (2002) Biochem. J. 366: 353-65), y un anticuerpo monoclonal de ratón denominado 5T4 (Patente de E.E.U.U. N° 5.869.053). También se han descrito anticuerpos anti 5T4 monocatenarios, así como proteínas de fusión que incluyen secuencias de anticuerpo anti 5T4 fusionadas con una molécula terapéutica. Por ejemplo, las secuencias de anticuerpo anti 5T4 fusionadas con el dominio constante de IgG1 humano u con el dominio extracelular B7.1 inducen la citólisis de líneas celulares de tumor que expresan 5T4 ((Myers y col. (2002) Cancer Gene Ther. 9: 884-896, Shaw y col. (2000) Biochim. Biophys. Acta. 1524: 238-246; Publicación de solicitud de Patente de E.E.U.U. N° 2003/0018004). De forma similar, un anticuerpo monocatenario anti 5T4 fusionado con un superantígeno no puede estimular la citólisis dependiente de linfocitos T de células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas *in vitro* (Forsberg y col. (2001) Br. J. Cancer 85: 129-136). Un ensayo clínico de fase 1 usando PNU-214936, un fragmento Fab murino del anticuerpo monoclonal 5T4 fusionado con una enterocitotoxina A estafilocócica de superantígeno mutada (SEA), mostró toxicidad limitada y algo de respuesta antitumoral (Cheng y col. (2004) J. Clin. Oncol. 22(4):602-9). Como un enfoque terapéutico alternativo, también se han sugerido vacunas de 5T4 recombinantes para el tratamiento de cánceres (Mulryan y col. (2002) Mol. Cancer Ther. 1: 1129-37; Publicaciones de Solicitud de Patente del Reino Unido N° 2.370.571 y 2.378.704; Publicaciones de Solicitud de Patente de EP N° 1.160.323 y 1.152.060).

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti 5T4, conjugados de anti 5T4/fármaco, procedimientos para producir los anticuerpos desvelados y conjugados de anticuerpo/fármaco y procedimientos para su diagnóstico y uso terapéutico.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti 5T4, conjugados de los mismos y procedimientos para el uso de los mismos. También se proporcionan polipéptidos anti 5T4 aislados y ácidos nucleicos aislados que los codifican. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo anti 5T4 aislado, o fragmento del mismo, que comprende un dominio de unión a antígeno de, o que se une con un mismo epítipo de 5T4 que, un anticuerpo que comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 2 y una región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 4,
- (b) una región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 10 y una región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 12,
- (c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; o
- (d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12.

Los anticuerpos anti 5T4 de la invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente con el antígeno 5T4 humano, en los que el anticuerpo (a) comprende un dominio de unión a antígeno de los anticuerpos A1 o A3 murinos; (b) compite por la unión con 5T4 con los anticuerpos A1 o A3 murinos; (c) se une con un epítipo de 5T4 unido con los anticuerpos A1 o A3, o (d) comprende un fragmento de unión a 5T4 de un anticuerpo de (a)-(c). Los anticuerpos anti 5T4 de la invención pueden ser quiméricos, humanizados, monocatenarios, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)2, un fragmento Fv, tetramérico, tetravalente, multiespecífico, específico de dominio, un anticuerpo de un único dominio, una proteína de fusión o un monoclonal murino. Por ejemplo, los anticuerpos anti 5T4 humanizados de la invención incluyen anticuerpos que comprenden al menos una región variable de cadena pesada o al menos una región variable de cadena ligera, en los que el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo: (a) comprende un dominio de unión a antígeno de los anticuerpos A1 o A3 murinos; (b) compite por la unión con 5T4 con los anticuerpos A1 o A3 murinos; (c) se une con un epítipo de 5T4 unido con los anticuerpos A1 o A3; o (d) un fragmento de unión a 5T4 de un anticuerpo de (a)-(c).

Los anticuerpos anti 5T4 de la invención tienen una afinidad de unión por el antígeno 5T4 humano de al menos aproximadamente de  $1 \times 10^{-7}$  M a aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M. Los anticuerpos anti 5T4 desvelados y conjugados de los mismos también pueden mostrar unión específica dirigiéndose a las células que expresan 5T4 *in vivo*.

- Los anticuerpos anti 5T4 representativos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2; (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a los restos 20-138 de SEC ID N°: 2; (e) una secuencia de aminoácidos de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10; (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a los restos 20-141 de SEC ID N°: 10; (g) una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID N°: 49, 51, 52, 54, 56, 81 u 82; (h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a SEC ID N°: 51; (i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 78 % idéntica a SEC ID N°: 54; (l) una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a SEC ID N°: 81; o (m) una secuencia de aminoácidos que es al menos 78 % idéntica a SEC ID N°: 82.
- 10 Los anticuerpos anti 5T4 representativos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de los restos 21-147 de SEC ID N°: 4; (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 94 % idéntica a los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; (e) una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12; (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % idéntica a los restos 21-127 y de SEC ID N°: 12; (g) una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID N°: 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 83 u 84; (h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 83 % idéntica a SEC ID N°: 60; (i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 93 % idéntica a SEC ID N°: 70; (j) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a SEC ID N°: 76; (k) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a SEC ID N°: 76; (n) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEC ID N°: 83; o (o) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a SEC ID N°: 84.
- 15
- 20 Por ejemplo, un anticuerpo anti 5T4 puede comprender (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; o (c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12.
- 25
- Los anticuerpos anti 5T4 quiméricos y humanizados de la invención pueden comprender regiones constantes derivadas de regiones constantes humanas, tales como una región constante de cadena ligera humana derivada de la región constante de cadena ligera kappa humana y una región constante de cadena pesada humana derivada de una región constante de cadena pesada IgG1 humana o IgG4 humana.
- 30 Los anticuerpos anti 5T4 humanizados representativos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden (a) regiones marco conservadas que comprenden restos de una región marco conservada de anticuerpo humano; y (b) una o más CDR de la región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 4 o 12; o una o más CDR de la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 2 o 10. Por ejemplo, los restos de una región marco de anticuerpo humano pueden comprender (a) una región marco conservada de cadena ligera de anticuerpo humano de un clon de línea germinal de subgrupo IV DPK 24, un subgrupo V $\kappa$ III (DPK23, DPK22, DPK20, DPK21), o un clon de línea germinal de subgrupo V $\kappa$ I (DPK9, DPK1, 02, DPK7); (b) una región marco conservada de cadena pesada de anticuerpo humano seleccionada del grupo que consiste en DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), DP-75, DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b y VI-3 (VH1-03), DP-15 y V1-8 (VH1-08), DP-14 y V1-18 (VH1-18), DP-5 y V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 y YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 y DA-8 (VH1-f); (c) una secuencia consenso de una región marco conservada de cadena pesada de (b); o (d) una región marco conservada que es al menos 63 % idéntica a una región marco conservada de (a)-(c).
- 35
- 40 Los anticuerpos anti 5T4 humanizados representativos de la invención también pueden incluir dos o más CDR de SEC ID N°: 2, 4, 10 o 12, tales como dos o las tres CDR de la región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 4 o 12, o dos o las tres CDR de la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 2 o 10, o una o más CDR de la región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 4 o 12 y una o más CDR de la región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 2 o 12 o todas las CDR de SEC ID N°: 2, 4, 10 o 12.
- 45
- Los anticuerpos anti 5T4 quiméricos y humanizados representativos incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2; (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a los restos 20-138 de SEC ID N°: 2; (e) una secuencia de aminoácidos de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10; (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a los restos 20-141 de SEC ID N°: 10; (g) una secuencia de aminoácidos de los restos 1-119 de SEC ID N°: 49; (h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a los restos 1-119 de SEC ID N°: 49; o (i) una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada humanizada variable representada en las Figuras 9A-9C.
- 50
- 55 Los anticuerpos anti 5T4 quiméricos y humanizados adicionales de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada codificada por un ácido nucleico que comprende (a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEC ID N°: 1; (c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-423 de SEC ID N°: 9; (d) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1- 358 y de SEC ID N°: 48; (e) una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de A1 o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C.
- 60

Los anticuerpos anti 5T4 quiméricos y humanizados representativos incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 94 % idéntica a los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; (d) una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a los restos 23-130 de SEC ID N°: 8; (e) una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12; (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % idéntica a los restos 21 -127 de SEC ID N°: 12; o (g) una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de A1 o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C.

También se proporcionan conjugados de anticuerpo/fármaco para suministro de fármacos que comprenden (a) un anticuerpo anti 5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo de la invención; y (b) un fármaco, que está directa o indirectamente unido con el anticuerpo. Los fármacos representativos incluyen agentes terapéuticos, tales como citotoxinas, radioisótopos, agentes inmunomoduladores, agentes anti angiogénicos, agentes antiproliferativos, agentes proapoptóticos, agentes quimioterapéuticos y ácidos nucleicos terapéuticos. Una citotoxina puede ser, por ejemplo, un antibiótico, un inhibidor de la polimerización de tubulina, un agente alquilante, un inhibidor de síntesis de proteínas, un inhibidor de proteína quinasa, un inhibidor de fosfatasa, un inhibidor de topoisomerasa o una enzima. Son particularmente útiles para terapias antineoplásicas citotoxinas antibióticas, tales como caliqueamicina, N-acetil- $\gamma$ -caliqueamicina, o derivados de las mismas tales como N-acetil- $\gamma$ -caliqueamicina dimetil hidracida.

Los conjugados de anticuerpos anti 5T4/fármaco desvelados pueden incluir un engarce para unir el anticuerpo con el fármaco. Los engarces representativos incluyen ácido 4-(4'acetilfenoxi) butanoico (AcBut), ácido 3-acetilfenil ácido (AcPac) y ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida). Los conjugados de anticuerpo/fármaco también pueden incluir polietilenglicol u otros agentes para potenciar la incorporación de fármacos.

Para la administración de un fármaco a células que expresan 5T4, la presente invención proporciona procedimientos por los que las células se ponen en contacto con un conjugado de anticuerpo/fármaco que comprende (i) un anticuerpo anti 5T4 quimérico o humanizado y (ii) un fármaco que está unido con el anticuerpo anti 5T4 humanizado directa o indirectamente. De acuerdo con los procedimientos desvelados, el fármaco se internaliza dentro de la célula diana. También se desvelan en el presente documento procedimientos terapéuticos, que comprenden administrar al sujeto que tiene un cáncer positivo para 5T4 una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo anti 5T4/fármaco que comprende (i) un anticuerpo anti 5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo, y (ii) un agente terapéutico que está unido con el anticuerpo anti 5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo directa o indirectamente. Pueden combinarse terapias anti 5T4 de la invención con cualquier otra terapia conocida para un efecto mejorado. Puede administrarse un segundo agente terapéutico en combinación con un conjugado de anticuerpo anti 5T4/fármaco simultáneamente o de forma consecutiva en cualquier orden.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican regiones variables anti 5T4 humanizadas, que son útiles para la producción de los anticuerpos anti 5T4 humanizados desvelados. Los ácidos nucleicos representativos que codifican una región variable de cadena pesada anti 5T4 humanizada incluyen (a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEC ID N°: 1; (c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-423 de SEC ID N°: 9; (d) una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de SEC ID N°: 48, 50, 53 o 55. Los ácidos nucleicos representativos que codifican una región variable de cadena ligera anti 5T4 humanizada incluyen (a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 3; (c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 11; (d) una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera A1 o A3 humanizada de una cualquiera de SEC ID N°: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73 o 75.

### **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A-1C muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos anti-5T4 murinos A1, A2, A3. Las secuencias de aminoácidos se anotan para identificar regiones determinantes de complementariedad (CDR) con subrayado y la secuencia líder con doble subrayado.

La Figura 2 es una transferencia de Western preparada usando lisados celulares CT26/5T4 y explorada con los anticuerpos indicados.

Las Figuras 3A-3B son gráficos lineales que muestran curvas de respuesta y cinética de unión para dos preparaciones independientes de anticuerpos H8 y A1. Las preparaciones fueron sustancialmente equivalentes.

Las Figuras 4A-4C son gráficos lineales que muestran la modulación de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 por células MDAMB435/5T4. Los niveles de anticuerpo en la superficie celular se reducen a lo largo del tiempo (Figuras 4A, 4C (sólidas)), mientras que los niveles de anticuerpo en el sobrenadante permanecen constantes (Figuras 4B, 4C (abiertas)). FCM, fluorescencia celular media; sobt sobrenadante.

La Figura 5 es un diagrama esquemático de la construcción de Fc de 5T4 de ectodominio humano, la construcción de Fc de 5T4 de ectodominio de ratón, y las construcciones quiméricas de 5T4 de ratón/humano. Estas construcciones se usaron para el mapeo de epítomos como se describe en el Ejemplo 4.

Las Figuras 6A-6B muestran resultados gráficos de unión competitiva de H8 humanizado y cada uno de los anticuerpos indicados con la proteína de fusión de Fc de ectodominio de 5T4 humano. HuH8, anticuerpo H8 humanizado; ChiA1, anticuerpo quimérico A1; ChiA1+C67F, anticuerpo quimérico A1 que porta la mutación C67F; ChiA2, anticuerpo quimérico A2; muA2, anticuerpo murino A2; ChiA3, anticuerpo quimérico A3; ChiA3+C91Y, anticuerpo quimérico A3 que porta la mutación C91Y, muA3, anticuerpo murino A3; sin Ab, sin anticuerpo (control).

La Figura 7 es un diagrama lineal que muestra los epítomos de 5T4 humano unidos con H8, A1, A2 y A3. Los restos indicados son restos del antígeno 5T4 descritos por Myers y col. (1994) J. Biol. Chem. 269(12):9319-9324, también disponibles con el número de referencia de GenBank Z29083 (SEC ID N°: 87). LRR, repetición rica en leucina.

La Figura 8 muestra los resultados de ensayos esféricos realizados como se describe en el Ejemplo 6. Los conjugados de anti 5T4/caliqueamicina preparados usando los anticuerpos A1 y A3 inhibieron significativamente el crecimiento de células que expresaban 5T4 (MDAMB435/5T4) en comparación con células de control (MDAMB435/neo). CMA-676, conjugado de anti-CD33/caliqueamicina; huH8-AcBut-CalichDMH, anticuerpo H8 humanizado conjugado con caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut); CalichDMH, caliqueamicina no conjugada; A1-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A1 conjugado con caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut); A3-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A3 conjugado con caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut).

Las Figuras 9A-9H muestran secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada A1 humanizada versión 1 (SEC ID N°: 48-49); secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada A1 humanizada (VH huA1) versiones 1.2 y 2.0; secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera A1 humanizada (VL huA1) versiones 1.0, 2.0 y 3.0; secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada A2 humanizada versiones 1.0 y 2.0 (VH huA2); secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera A2 humanizada versiones 1.0 y 2.0 (VL huA2); secuencias humanizadas de la región variable de cadena pesada A3 humanizada versiones 1.0 y 2.0 (VH huA3); y secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera A3 humanizada versiones 1.0 y 2.0 (VL huA32). Las CDR están subrayadas.

Las Figuras 10A-10B muestran secuencias marco conservadas de región variable de cadena pesada humana representativas que pueden usarse para preparar anticuerpos anti 5T4 humanizados. La Figura 10A es un alineamiento de las secuencias de región variable de cadena pesada humana del subgrupo I (SEC ID N°: 14-24) y las secuencias marco conservadas consenso derivadas de las mismas (SEC ID N°: 25-27). La Figura 10B muestra las secuencias de genes de línea germinal humana de los subgrupos VH7 y VH3 (SEC ID N°: 88-93).

La Figura 11 es un alineamiento de las secuencias de región variable de cadena ligera humana del subgrupo V<sub>κ</sub>III (SEC ID N°: 29-34). Secuencias encuadradas, CDR.

La Figura 12 es un alineamiento de las secuencias de región variable de cadena ligera humana del subgrupo V<sub>κ</sub>I (SEC ID N°: 35-44). Secuencias encuadradas, CDR.

La Figura 13 muestra secuencias de línea germinal humana adicionales de los subgrupos V<sub>κ</sub> 1 y V<sub>κ</sub>IV, que tienen regiones marco conservadas que pueden usarse para preparar anticuerpos anti 5T4 humanizados (SEC ID N°: 94-99).

La Figura 14 muestra las secuencias de aminoácidos de regiones constantes humanas representativas que pueden usarse para preparar anticuerpos anti 5T4 quiméricos y humanizados (SEC ID N°: 45-47).

La Figura 15 muestra las secuencias de aminoácidos de un antígeno 5T4 de mono cynomolgus de longitud completa y un antígeno 5T4 de tití de cola negra parcial. Secuencias subrayadas, secuencias líder. Para cada secuencia, el ectodominio de 5T4 incluye los aminoácidos 30-356.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **I. Anticuerpos anti 5T4**

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos murinos que se unen con el antígeno 5T4 humano y que son útiles para desarrollar inmunoterapias dirigidas. El antígeno 5T4 humano es una fosfoproteína no glucosilada de 72 kDa hallada en la superficie de células trofoblásticas y numerosos tipos de células cancerosas. Véase Hole y col. (1988) Br. J. Cancer 57: 239-46, Hole y col. (1990) Int. J. Cancer 45: 179-184; Publicación internacional de PCT N° WO89/07947; Patente de E.E.U.U. N° 5.869.053.

Los anticuerpos anti 5T4 murinos de la invención se designan A1 y A3, y se prepararon como se describe en el ejemplo 1. También se proporcionan anticuerpos anti 5T4 derivados de A1 y A3, y que se unen específicamente con el antígeno 5T4 humano. Por ejemplo, los anticuerpos anti 5T4 de la invención incluyen anticuerpos que comprenden restos de unión a antígeno de los anticuerpos A1 y A3; anticuerpos que compiten por la unión con el antígeno 5T4 con los anticuerpos A1 o A3; y anticuerpos que se unen con el mismo epítopo de 5T4 que los anticuerpos A1 o A3.

En particular, los anticuerpos A1, A2 y A3 desvelados comprenden cada uno un sitio de unión a antígeno que reconoce un epítopo único en el antígeno 5T4 humano. Cada uno de estos anticuerpos se une también con un epítopo distinto del que se une con H8, y cada uno de A1, A2 y A3 es incapaz de competir con el anticuerpo H8 por la unión con 5T4 humano. Véase Ejemplos 4-5 y Figuras 6-7. En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente con los restos 30-163 de 5T4 humano (por ejemplo, A3), anticuerpos que se unen específicamente con los restos 224-276 de 5T4 humano (por ejemplo, A1). También se proporcionan antígenos 5T4 humanos que comprenden epítomos que se unen con un anticuerpo A1, A2 o A3. Por ejemplo, la invención proporciona fragmentos antigénicos de 5T4 que comprenden los restos 30-163, 224-276 y 224-356 de un antígeno 5T4 nativo o de longitud completa.

La unión específica de los anticuerpos anti 5T4 desvelados se refiere a una unión preferente de un anticuerpo con el antígeno 5T4 humano en una muestra heterogénea que comprende múltiples antígenos diferentes. Típicamente, se produce una unión específica si la afinidad de unión es de al menos aproximadamente  $10^{-7}$  M o superior, tal como al

- menos aproximadamente  $10^{-8}$  M o superior, incluyendo al menos aproximadamente  $10^{-9}$  M o superior, al menos aproximadamente  $10^{-11}$  M o superior o al menos aproximadamente  $10^{-12}$  M o superior. Por ejemplo, la unión específica de un anticuerpo de la invención con un antígeno 5T4 humano incluye unión en el intervalo de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M a aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M, tal como dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M a aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M, o dentro de un intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M y aproximadamente  $1 \times 10^{-11}$  M, o dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M a aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M, o dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M a aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M. La unión específica también se refiere a dirección selectiva de un anticuerpo anti 5T4 a células que expresan 5T4 después de la administración del anticuerpo a un sujeto.
- Los anticuerpos anti-5T4 de la invención pueden tener una estructura tetramérica (por ejemplo, similar a los anticuerpos de origen natural), o pueden comprender cualquier otra estructura que tiene al menos una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina o al menos una región de cadena pesada de inmunoglobulina, o fragmentos de unión a 5T4 de las mismas (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab modificado, F(ab')<sub>2</sub> o Fv). También se incluyen anticuerpos de dominio sencillo, en los que una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR), pero menos de las 6 CDR, constituyen una región de unión a antígeno. La invención también abarca anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos superhumanizados, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos tetravalentes y/o anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos). Estos descriptores de anticuerpos no son mutuamente excluyentes.
- Son anticuerpos de origen natural las glucoproteínas tetraméricas (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Las dos cadenas pesadas se unen entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada se liga a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Cada una de las cadenas ligera y pesada se caracteriza además por una región variable amino terminal y una región constante. Las regiones variables incluyen secuencias que difieren extensivamente entre anticuerpos y determinan sustancialmente la afinidad de unión y especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Las regiones variables de cada una de las cadenas ligera y pesada se alinean para formar el dominio de unión a antígeno.
- Los anticuerpos quiméricos comprenden secuencias de al menos dos especies diferentes. Como ejemplo, pueden usarse técnicas de clonación recombinante para incluir regiones variables, que contienen los sitios de unión a antígeno, de un anticuerpo no humano (es decir, un anticuerpo preparado en una especie no humana inmunizada con el antígeno) y regiones constantes derivadas de una inmunoglobulina humana.
- Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos A1 y A3, es decir, (a) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; y (c) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12. Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos pueden incluir una región variable de cadena pesada expuesta como los aminoácidos 1-119 de SEC ID N°: 49, o una cualquiera de las regiones variables de cadena pesada humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C, y una región variable de cadena ligera humanizada, también representada en las Figuras 9A-9C. La preparación de anticuerpos anti 5T4 quiméricos y humanizados representativas de la invención se describe en el ejemplo 7.
- Los anticuerpos anti-5T4 de la invención también pueden comprender una región variable de cadena pesada y/o cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que deriva de o es sustancialmente similar a las regiones variables de A1 o A3, o sustancialmente similar a las regiones variables de A1 y A3 humanizadas. Con respecto a regiones variables de cadena pesada y cadena ligera sustancialmente idénticas, las secuencias sustancialmente idénticas son al menos aproximadamente 90 % idénticas a las secuencias de región variable de una cualquiera de las SEC ID N°: 1-12 o a las regiones variables de A1, A2 y A3 humanizadas en las Figuras 9A-9C, tales como al menos 91 % idénticas, al menos 92 % idénticas, al menos 93 % idénticas, al menos 94 % idénticas, al menos 95 % idénticas, al menos 96 % idénticas, al menos 97 % idénticas, al menos 98 % idénticas o al menos 99 % idénticas.
- Los anticuerpos anti 5T4 quiméricos representativos de la invención, es decir, anticuerpos que se unen específicamente con el antígeno 5T4, también incluyen los anticuerpos que tienen (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta como los restos 20-138 de SEC ID N°: 2, los restos 20-141 de SEC ID N°: 10, o una cualquiera de las regiones variables de cadena pesada de A1, A2 o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C; (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 85 % idéntica a los restos 20-138 de SEC ID N°: 2; (c) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 86 % idéntica a los restos 19-135 de SEC ID N°: 6; (d) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 91 % idéntica a los restos 20-141 de SEC ID N°: 10; (e) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a los restos 1-119 de SEC ID N°: 49; o (f) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de una cualquiera de las regiones variables de A1 o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

También se desvela en el presente documento que una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado, que se une específicamente con el antígeno 5T4, puede codificarse por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEC ID N°: 1, nucleótidos 55-405 de SEC ID N°: 5, nucleótidos 58-423 de SEC ID N°: 9, nucleótidos 1-358 de SEC ID N°: 48; o un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de A1, A2 o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C; (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEC ID N°: 1, nucleótidos 55-405 de SEC ID N°: 5, o nucleótidos 58-423 de SEC ID N°: 9. Por ejemplo, una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-5T4 quimérico puede codificarse por un ácido nucleico que es al menos 98 % idéntico a los nucleótidos 58-414 de SEC ID N°: 1, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a los nucleótidos 55-405 de SEC ID N°: 5, o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 89 % idéntica a los nucleótidos 1-358 de SEC ID N°: 48. Una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-5T4 quimérico también puede codificarse por un ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEC ID N°: 1, nucleótidos 55-405 de SEC ID N°: 5, nucleótidos 58-423 de SEC ID N°: 9, o nucleótidos 1-358 de SEC ID N°: 48, en condiciones de hibridación rigurosas, por ejemplo condiciones de lavado finales de SSC 0,1X a 65 °C.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos representativos de la invención incluyen además los anticuerpos que tienen (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta como los restos 21-127 de SEC ID N°: 4, restos 21-127 de SEC ID N°: 12, o restos de una región variable de cadena ligera de A1 o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos 90 % idéntica a los restos 21-127 de SEC ID N°: 4, restos 23-130 de SEC ID N°: 8, o restos 21-127 de SEC ID N°: 12. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera puede comprender (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos 94 % idéntica a los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; (c) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos 98 % idéntica a los restos 21-127 de SEC ID N°: 12; (d) o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de una cualquiera de las regiones variables de cadena ligera de A1 o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

Como se desvela en el presente documento una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-5T4, quimérico que se une específicamente con el antígeno 5T4, puede codificarse por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 3, nucleótidos 67-390 de SEC ID N°: 7, nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 11, o nucleótidos que codifican una cualquiera de las regiones variables de cadena ligera de A1, A2 o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C; o (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica a los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 3, nucleótidos 67-390 de SEC ID N°: 7, o nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 11. Por ejemplo, una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-5T4 quimérico puede codificarse por un ácido nucleico que comprende (a) una secuencia de nucleótidos que es al menos 97 % idéntica a los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 3; (b) una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a los nucleótidos 67-390 de SEC ID N°: 7; o (c) una secuencia de nucleótidos que es al menos 99 % idéntica a los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 11. Una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-5T4 quimérico, que se une específicamente con el antígeno 5T4, también puede codificarse por un ácido nucleico que hibrida específicamente con el complemento de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 3, nucleótidos 67-390 de SEC ID N°: 7, o nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 11, en condiciones de hibridación rigurosas, por ejemplo condiciones de lavado final de SSC 0,1X a 65 °C.

Los anticuerpos humanizados son un tipo de anticuerpo quimérico en el que los restos de región variable responsables de la unión a antígeno (es decir, restos de una región determinante de complementariedad, región determinante de complementariedad abreviada, o cualquier otro resto que participe en la unión a antígeno) derivan de una especie no humana, mientras que los restos de región variable restantes (es decir, restos de las regiones marco conservadas) y regiones constantes derivan, al menos en parte, de secuencias de anticuerpo humano. Un subconjunto de restos de región marco conservada y restos de región constante de un anticuerpo humanizado pueden derivar de fuentes no humanas. Las regiones variables de un anticuerpo humanizado también se describen como humanizadas (es decir, una región variable de cadena ligera o pesada humanizada). La especie no humana es típicamente la usada para inmunización con antígeno, tal como ratón, rata, conejo, primate no humano u otra especie mamífera no humana. Los anticuerpos humanizados son típicamente menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos tradicionales y muestran estabilidad mejorada después de su administración a seres humanos. Véase, por ejemplo, Benincosa y col. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:810-6; Kalofonos y col. (1994) *Eur. J. Cancer* 30A:1842-50; Subramanian y col. (1998) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17:110-5.

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son restos de regiones variables de anticuerpo que participan en la unión a antígeno. Se usan de forma habitual varios sistemas de numeración para identificar CDR. La definición de Kabat se base en la variabilidad de secuencia y la definición de Chothia se basa en la localización de las regiones de bucles estructurales. La definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Las CDR de la región variable de cadena ligera están delimitadas por los restos en las posiciones 24 y 34 (CDR1-L), 50 y 56 (CDR2-L), y 89 y 97 (CDR3-L) de acuerdo con el algoritmo de Kabat, Chothia, o AbM. De acuerdo con la

- definición de Kabat, las CDR de la región variable de cadena pesada están delimitadas por los restos en las posiciones 31 y 35B (CDR1-H), 50 y 65 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Kabat). De acuerdo con la definición de Chothia las CDR de la región variable de cadena pesada están delimitadas por los restos en las posiciones 26 y 32 (CDR1-H), 52 y 56 (CDR2-H) y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Chothia). De acuerdo con la definición de AbM, las CDR de la región variable de cadena pesada están delimitadas por los restos en las posiciones 26 y 35B (CDR1-H), 50 y 58 (CDR2-H) y 95 y 102 (CDR3-H) (numeración de acuerdo con Kabat). Véase Martin y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272; Martin y col. (1991) Methods Enzymol. 203: 121-153; Pedersen y col. (1992) Immunomethods 1: 126; y Rees y col. (1996) en Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-172.
- 10 Las regiones determinantes de especificidad (SDR) son restos dentro de las CDR que interactúan directamente con el antígeno. Las SDR corresponden a restos hipervariables. Véase (Padlan y col. (1995) FASEB J. 9: 133-139).
- Los restos marco conservados son los restos de regiones variables de anticuerpo distintos de los restos hipervariables o CDR. Los restos marco conservados pueden derivar de un anticuerpo humano de origen natural, tal como un marco conservado humano que es sustancialmente similar a una región marco conservada de los anticuerpos A1, A2 o A3. También pueden usarse secuencias marco conservadas artificiales que representan un consenso entre las secuencias individuales. Cuando se selecciona una región marco conservada para humanización, pueden repetirse secuencias que están ampliamente representadas en seres humanos frente a secuencias menos habituales. Pueden realizarse mutaciones adicionales de las secuenciasceptoras de marco conservado humano para restaurar restos murinos que se cree que están implicados en los contactos con el antígeno y/o restos implicados en la integridad estructural del sitio de unión a antígeno, o para mejorar la expresión de anticuerpos. Puede usarse una predicción de estructura peptídica para analizar las secuencias de región pesada y ligera variable humanizada para identificar y evitar sitios de modificación de proteínas postraduccionales introducidos por el diseño de humanización.
- 15 Pueden prepararse anticuerpos humanizados usando uno cualquiera de la diversidad de procedimientos incluyendo revestimiento, injerto de regiones determinantes de complementariedad (CDR), injerto de CDR abreviadas, injerto de regiones determinantes de especificidad (SDR), y ensamblaje de Frankenstein, como se describe posteriormente. Los anticuerpos humanizados también incluyen anticuerpos superhumanizados en los que se han introducido uno o más cambios en las CDR. Por ejemplo, pueden sustituirse con restos humanos restos no humanos en las CDR. Estos enfoques generales pueden combinarse con mutagénesis convencional y técnicas de síntesis para producir un anticuerpo anti-5T4 de cualquier secuencia deseada.
- 20 El revestimiento se basa en el concepto de reducir las secuencias de aminoácidos potencialmente inmunogénicas en un anticuerpo de roedor u otro no humano remodelando la superficie del exterior accesible al disolvente del anticuerpo con secuencias de aminoácidos humanas. Por lo tanto, los anticuerpos revestidos parecen menos ajenos a células humanas que el anticuerpo no humano no modificado. Véase Padlan (1991) Mol. Immunol. 28:489-98. Un anticuerpo no humano se reviste identificando restos de la región marco conservada exterior expuesta en el anticuerpo no humano que son diferentes de los de las mismas posiciones en regiones marco conservadas de un anticuerpo humano, y por reemplazo de los restos identificados con aminoácidos que típicamente ocupan estas mismas posiciones en anticuerpos humanos.
- 25 El injerto de CDR se realiza reemplazando una o más CDR de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano u otro anticuerpo que comprende restos marco conservados deseados) con CDR de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo no humano). Los anticuerpos aceptores pueden seleccionarse basándose en la similitud de los restos marco conservados entre un anticuerpo aceptor candidato y un anticuerpo donante. Por ejemplo, de acuerdo con el enfoque de Frankenstein, se identifica que las regiones marco conservadas humanas tienen homología de secuencias sustancial con cada región marco conservada del anticuerpo no humano relevante, y se injertan CDR del anticuerpo no humano en el compuesto de las regiones marco conservadas humanas diferentes. Se describe un procedimiento relacionado que también es útil para la preparación de anticuerpos de la invención en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N°: 2003/0040606.
- 30 El injerto de CDR abreviadas es un enfoque relacionado. Las CDR abreviadas incluyen los restos determinantes de especificidad y aminoácidos adyacentes, incluyendo los de las posiciones 27d-34, 50-55 y 89-96 en la cadena ligera, y en las posiciones 31-35b, 50-58, y 95-101 en la cadena pesada (convención de numeración de (Kabat y col. (1987)). Véase (Padlan y col. (1995) FASEB J. 9: 133-9). El injerto de restos determinantes de especificidad (SDR) se basa en el entendimiento de que la especificidad de unión y afinidad de un sitio de combinación de anticuerpo se determina por los restos más altamente variables dentro de cada una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). El análisis de las estructuras tridimensionales de los complejos de anticuerpo-antígeno, combinado con el análisis de los datos de secuencias de aminoácidos disponibles puede usarse para modelar la variabilidad de secuencia basándose en la diferencia estructural de restos de aminoácidos que aparecen en cada posición dentro de la CDR. Las SDR se identifican como secuencias polipeptídicas mínimamente inmunogénicas consistentes en restos de contacto. Véase Padlan y col. (1995) FASEB J. 9: 133-139.
- 35 En general, se seleccionan marcos conservados aceptores humanos basándose en que sean sustancialmente similares a las regiones marco conservadas de los anticuerpos donantes, o que son más similares a la secuencia

consenso de la subfamilia de la región variable. Después del injerto, pueden realizarse cambios adicionales en las secuencias donantes y/o aceptoras para optimizar la unión de anticuerpos, funcionalidad, uso codónico, niveles de expresión, etc., incluyendo la introducción de restos no humanos en las regiones marco conservadas. Véase, por ejemplo, Publicación internacional de PCT N°: WO 91/09967.

5 Para el injerto de CDR en una región marco conservada variable de cadena pesada, las secuencias marco conservadas útiles pueden derivar de un DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), DP-75, DP-8 (VH1-2), DP-25, VI-2b y VI-3 (VH1-03), DP-15 y V1-8 (VH1-08), DP-14 y V1-18 (VH1-18), DP-5 y V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 y YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 y DA-8 (VH1-f). Las regiones variables de cadena pesada representativas que contienen restos marco conservados para humanización se exponen como SEC ID N°: 13-24 y 88-93. Los marcos conservados representativos que representan un consenso de los restos marco conservados de VH1 se exponen como SEC ID N°:25-27. Véase también Figuras 10A-10B.

15 Para el injerto de CDR en una región marco conservada variable de cadena ligera, las secuencias marco conservadas útiles pueden derivar de un clon de línea germinal de subgrupo IV DPK24, un subgrupo V<sub>κ</sub>III (DPK23, DPK22, DPK20, DPK21), o un clon de línea germinal de subgrupo V<sub>κ</sub>I (DPK9, DPK1, 02, DPK7). Las regiones variables de cadena ligera representativas que contienen restos marco conservados para humanización se exponen como SEC ID N°: 28-34, 35-44, y 94-99. Véase Figuras 11-14.

20 Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención incluyen anticuerpos que tienen una o más CDR de un anticuerpo anti-5T4 no humano seleccionado de CDR de una región variable de cadena pesada de una cualquiera de SEC ID N°: 2 o 10, o una región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 4 o 12. Por ejemplo, los anticuerpos anti-5T4 humanizados pueden comprender dos o más CDR seleccionadas de CDR de una región variable de cadena pesada de una cualquiera de SEC ID N°: 2 o 10, o una región variable de cadena ligera de una cualquiera de SEC ID N°: 4 o 12. Los anticuerpos anti-5T4 humanizados también pueden comprender una cadena pesada que comprende una región variable que tiene dos o tres CDR de una cualquiera de SEC ID N°: 2 o 10, y una cadena ligera que comprende una región variable que tiene dos o tres CDR de una cualquiera de SEC ID N°: 4 o 12.

25 Pueden construirse anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención en los que la región variable de una primera cadena (es decir, la región variable de cadena ligera o la región variable de cadena pesada) está humanizada, y en los que la región variable de la segunda cadena no está humanizada (es decir, una región variable de un anticuerpo producido en una especie no humana). Estos anticuerpos son de un tipo de anticuerpo humanizado denominados anticuerpos semi humanizados. Los anticuerpos anti-5T4 no humanos que pueden usarse para preparar anticuerpos semi humanizados incluyen los anticuerpos A1 y A3, como se desvela en el presente documento, así como el anticuerpo H8 descrito en la Publicación Internacional de PCT N°: WO 98/55607 y en Forsberg y col. (1997) J. Biol. Chem. 272(19): 124430-12436, o el anticuerpo monoclonal de rata descrito en Woods y col. (2002) Biochem. J. 366: 353-65. Por ejemplo, un anticuerpo anti-5T4 semi humanizado puede comprender una región variable de cadena pesada expuesta como los aminoácidos 1-119 de SEC ID N°: 49 o aminoácidos de una región variable de cadena pesada de A1 o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C, y una región variable de cadena ligera de una cualquiera de SEC ID N°: 4 o 12.

30 Las regiones constantes de anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados pueden derivar de regiones constantes de uno cualquiera de IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, cualquier isotipo de los mismos (por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de IgG), así como versiones mutadas de los mismos. La elección de un isotipo humano y modificación de aminoácidos particulares en el isotipo puede potenciar o eliminar la activación de mecanismos de defensa del huésped y alterar la biodistribución de anticuerpos. Véase (Reff y col. (2002) Cancer Control 9: 152-66). Se exponen regiones constantes representativas útiles para preparar anticuerpos quiméricos y humanizados de la invención como SEC ID N°: 45-47. También pueden usarse regiones constantes de cadena ligera lambda humanas, incluyendo versiones variantes o mutantes. Para clonar secuencias que codifican regiones constantes de inmunoglobulina, pueden suprimirse secuencias intrónicas.

35 Pueden construirse anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados usando técnicas convencionales conocidas en este campo. Por ejemplo, pueden prepararse regiones variables hibridando entre sí oligonucleótidos solapantes que codifican las regiones variables y ligándolas en un vector de expresión que contiene una región constante de anticuerpo humano. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York y Patentes de E.E.U.U N°: 4.196.265; 4.946.778; 5.091.513; 5.132.405; 5.260.203; 5.677.427; 5.892.019; 5.985.279; 6.054.561. Pueden prepararse anticuerpos tetravalentes (H<sub>4</sub>L<sub>4</sub>) que comprenden dos anticuerpos tetraméricos intactos, incluyendo homodímeros y heterodímeros, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional de PCT N°: WO 02/096948. También pueden prepararse 40 dímeros de anticuerpos mediante la introducción de un resto o restos de cisteína en la región constante del anticuerpo, que promueven la formación de enlaces disulfuro intercatenarios, mediante el uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales (Wolff y col. (1993) Cancer Res. 53: 2560-5), o mediante la producción recombinante para incluir una región constante doble (Stevenson y col. (1989) Anticancer Drug Des. 3: 219-30). Pueden prepararse fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos de la invención, por ejemplo, mediante la expresión de secuencias de anticuerpo truncadas o mediante la digestión postraducciona de anticuerpos de longitud completa.

Pueden prepararse fácilmente variantes de anticuerpos anti-5T4 de la invención, es decir, los anticuerpos A1 y A3 así como versiones quiméricas y humanizadas de los mismos, para incluir diversos cambios, sustituciones, inserciones y deleciones. Por ejemplo, pueden optimizarse secuencias de anticuerpo para uso codónico en el tipo celular usado para la expresión de anticuerpos. Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, puede incorporarse un epítipo de unión a receptor de recuperación, si no está presente ya, en la secuencia de cadena pesada del anticuerpo. Véase Patente de E.E.U.U N°: 5.739.277. Las modificaciones adicionales para potenciar la estabilidad del anticuerpo incluyen modificación de IgG4 para reemplazar la serina en el resto 241 con prolina. Véase Angal y col. (1993) Mol. Immunol. 30: 105-108. Otros cambios útiles incluyen sustituciones según se requieran para optimizar la eficacia en la conjugación del anticuerpo con un fármaco. Por ejemplo, un anticuerpo puede modificarse en su extremo carboxilo terminal para incluir aminoácidos para unión con fármacos, por ejemplo pueden añadirse uno o más restos de cisteína. Las regiones constantes pueden modificarse para introducir sitios para la unión de carbohidratos u otros restos.

Pueden producirse variantes de anticuerpos anti-5T4 de la invención usando técnicas recombinantes convencionales, incluyendo mutagénesis dirigida, o clonación de recombinación. Puede prepararse un repertorio diversificado de anticuerpos anti-5T4 mediante procedimientos de ordenamiento génico y conversión génica en animales no humanos transgénicos (Publicación de Patente de E.E.U.U N°: 2003/0017534), que después se ensayan con respecto a actividades relevantes usando ensayos funcionales. En realizaciones particulares de la invención, se obtiene variantes anti-5T4 usando un protocolo de maduración de afinidad para mutación de CDR (Yang y col. (1995) J. Mol. Biol. 254: 392-403), combinación de cadenas (Marks y col. (1992) Biotechnology (NY) 10: 779-783), uso de cepas mutadas de *E. coli* (Low y col. (1996) J. Mol. Biol. 260: 359-368), combinación de ADN (Patten y col. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-733), presentación de fagos (Thompson y col. (1996) J. Mol. Biol. 256: 77-88), y PCR sexual (Cramer y col. (1998) Nature 391: 288-291). Para aplicaciones de inmunoterapia, los ensayos funcionales relevantes incluyen unión específica con antígeno 5T4 humano, internalización de anticuerpos y dirección a un sitio o sitios tumorales cuando se administra a un animal que porta tumores, como se describe posteriormente en el presente documento.

La presente invención proporciona además células y líneas celulares que expresan anticuerpos anti-5T4 de la invención. Las células huésped representativas incluyen células de mamífero y humanas, tales como células CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1 y células COS. Se conocen en la técnica procedimientos para generar una línea celular estable después de la transformación de una construcción heteróloga en una célula huésped. Las células huésped representativas no de mamífero incluyen células de insecto (Potter y col. (1993) Int. Rev. Immunol. 10(2-3):103-112). También pueden producirse anticuerpos en animales transgénicos (Houdebine (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13(6):625-629) y plantas transgénicas (Schillberg y col. (2003) Cell Mol. Life Sci. 60(3):433-45).

## II. Ácidos nucleicos y polipéptidos Anti-5T4

La presente invención proporciona además ácidos nucleicos aislados que codifican regiones variables de cadena pesada y cadena ligera anti-5T4 y polipéptidos aislados codificados por los ácidos nucleicos desvelados. Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención incluyen las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de A1 y A3, regiones variables de A1 y A3 humanizadas, y variantes de las mismas. Los ácidos nucleicos y polipéptidos aislados pueden usarse para preparar anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados.

### II.A. Ácidos nucleicos Anti-5T4

Los ácidos nucleicos son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria, bicatenaria o tricatenaria. A no ser que se limite específicamente, los ácidos nucleicos pueden contener análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades similares al ácido nucleico natural de referencia. Los ácidos nucleicos incluyen genes, ADNc, ARNm y ARNc. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse o pueden derivar de cualquier fuente biológica, incluyendo cualquier organismo. Se describen procedimientos representativos para clonar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-5T4 en los Ejemplos 1 y 7.

Los ácidos nucleicos representativos de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 9, 11 y 48. En particular, los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada de A1 y A3 comprenden los nucleótidos 58-41 de SEC ID N°: 1, y los nucleótidos 58-423 de SEC ID N°: 9, que codifican regiones variables de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas como los restos 20-138 de SEC ID N°: 2, y los restos 20-141 de SEC ID N°: 10, respectivamente. Un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de A1 humanizada comprende los nucleótidos 1-358 de SEC ID N°: 48. Los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena ligera de A1 y A3 comprenden los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 3, y los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 11, respectivamente, que codifican regiones variables de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas como los restos 21-127 de SEC ID N°: 4, y los restos 21-127 de SEC ID N°: 12, respectivamente. Los ácidos nucleicos adicionales de la invención comprenden nucleótidos que codifican las regiones variables de A1 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

Los ácidos nucleicos de la divulgación también pueden comprender una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 48, incluyendo secuencias de nucleótidos

que son al menos 90 % idénticas a las secuencias codificantes de región variable de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9 y 11, tal como al menos aproximadamente 91 % idénticas o al menos 92 % idénticas, tal como al menos 93 % idénticas, al menos 94 % idénticas, al menos 95 % idénticas, al menos 96 % idénticas, al menos 97 % idénticas, al menos 98 % idénticas o al menos 99 % idénticas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la divulgación pueden comprender (a) una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia codificante de región variable de SEC ID N°: 1; (b) una secuencia de nucleótidos que es al menos 97 % idéntica a la secuencia codificante de región variable de SEC ID N°: 3; (c) una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia codificante de región variable de SEC ID N°: 5; (d) una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia codificante de región variable de SEC ID N°: 7; (e) una secuencia de nucleótidos que es al menos 99 % idéntica a la secuencia codificante de región variable de SEC ID N°: 11; o (f) una secuencia de nucleótidos que al menos 89 % idéntica a la secuencia codificante de región variable de SEC ID N°: 48. Las secuencias se comparan con respecto a la correspondencia máxima usando un algoritmo de comparación de secuencias usando la secuencia codificante de región variable de longitud completa de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 48, o secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de región variable de A1, A2 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9H como la secuencia de consulta, como se describe posteriormente en el presente documento, o por inspección visual. Véase también Ejemplo 1 y Tabla 1, y Ejemplo 7 y Tabla 11.

De acuerdo con la presente divulgación, las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser secuencias polimórficas, es decir, secuencias alternativas o alelos en una población. Una diferencia alélica puede ser tan pequeña como de un par de bases. Las secuencias sustancialmente idénticas también pueden comprender secuencias mutadas, incluyendo secuencias que comprenden mutaciones silenciosas. Una mutación puede comprender uno o más cambios de restos, una delección de uno o más restos, o una inserción de uno o más restos adicionales.

De acuerdo con la presente divulgación, los ácidos nucleicos sustancialmente idénticos se identifican adicionalmente como ácidos nucleicos que hibridan específicamente con o hibridan sustancialmente con la longitud completa de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 48; la longitud completa de una secuencia codificante de región variable de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 48; o las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de región variable de A1, A2 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9H, en condiciones rigurosas. En el contexto de la hibridación de ácido nucleico, dos secuencias de ácido nucleico que se comparan pueden designarse una sonda y una diana. Una sonda es una molécula de ácido nucleico de referencia, y una diana es una molécula de ácido nucleico de ensayo, hallada con frecuencia dentro de una población heterogénea de moléculas de ácido nucleico. Una secuencia diana es sinónimo de una secuencia de ensayo.

De acuerdo con la presente divulgación, para estudios de hibridación, las sondas útiles son complementarias de o imitan al menos una secuencia de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Preferentemente, las sondas comprenden de 14 a 20 nucleótidos, o incluso más cuando se desee, tal como 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300 o 500 nucleótidos o hasta la longitud completa de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 48; la longitud completa de una secuencia codificante de región variable de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 o 48; o secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de región variable de A1, A2 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C. Dichos fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, por síntesis química del fragmento, por aplicación de tecnología de amplificación de ácido nucleico o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante.

La hibridación específica se refiere a la unión, formación de doble cadena o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, (por ejemplo, ADN o ARN celular total). La hibridación específica puede acomodar desapareamientos entre la secuencia de sonda y la diana dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación.

Las condiciones de hibridación rigurosas y condiciones de lavado de hibridación rigurosas en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico tales como análisis de transferencia de Southern y Northern son dependientes tanto de secuencia como de ambiente. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Se encuentra una guía exhaustiva para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I capítulo 2, Elsevier, Nueva York, Nueva York. Generalmente, se seleccionan condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Típicamente, en condiciones rigurosas una sonda hibridará específicamente con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

La  $T_m$  es la temperatura (con fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Se seleccionan condiciones muy rigurosas que sean iguales a la  $T_m$  para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para análisis de transferencia de Southern o Northern de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de aproximadamente 100 restos complementarios es hibridación durante una noche en formamida al 50 % con 1 mg de heparina a 42 °C. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es 15 minutos en SSC 0,1X a 65 °C. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es 15 minutos en tampón SSC 0,2X a 65 °C. Véase Sambrook y col., eds (1989) Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, para una descripción de tampón de SSC. Con frecuencia, un lavado de alta rigurosidad se precede de un lavado de baja rigurosidad para retirar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de condiciones de lavado de rigurosidad media para una doble cadena de más de aproximadamente 100 nucleótidos, es 15 minutos en SSC 1X a 45 °C. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad para una doble cadena de más de aproximadamente 100 nucleótidos, es de 15 minutos en SSC 4X a 6X a 40 °C. Para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas típicamente implican concentraciones salinas de menos de aproximadamente 1 M de ion Na<sup>+</sup>, típicamente aproximadamente de 0,01 a 1 M de concentración de ion Na<sup>+</sup> (u otras sales) a pH 7,0-8,3, y la temperatura es típicamente al menos aproximadamente 30 °C. Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación de señal y ruido de 2 veces (o mayor) la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.

Los siguientes son ejemplos de condiciones de hibridación y lavado que pueden usarse para identificar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a secuencias de nucleótidos de referencia de la presente divulgación: una secuencia de nucleótidos de sonda preferentemente hibrida con una secuencia de nucleótidos diana en dodecil sulfato sódico (SDS) 7 %, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C seguido de lavado en SSC 2X, SDS 0,1 % a 50 °C; más preferentemente, una secuencia de sonda y diana hibridan en dodecil sulfato sódico (SDS) 7 %, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M EDTA 1 mM a 50 °C seguido de lavado en SSC 1X, SDS 0,1 % a 50 °C; más preferentemente, una secuencia sonda y diana hibridan en dodecil sulfato sódico (SDS) 7 %, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C seguido de lavado en SSC 0,5X, SDS, 0,1 % a 50 °C; más preferentemente, una secuencia sonda y diana hibridan en dodecil sulfato sódico (SDS) 7 %, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1mM a 50 °C seguido de lavado en SSC 0,1X, SDS 0,1 % a 50 °C; más preferentemente, una secuencia sonda y diana hibrida en dodecil sulfato sódico (SDS) 7 %, NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, EDTA 1mM a 50 °C seguido de lavado en SSC 0,1X, SDS 0,1 % a 65 °C.

Un indicio adicional de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, comparten una estructura tridimensional general o son equivalentes biológicamente funcionales. Estos términos se definen adicionalmente posteriormente en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas aún son sustancialmente idénticas si las proteínas correspondientes son sustancialmente idénticas. Esto puede suceder, por ejemplo, cuando dos secuencias de nucleótidos comprenden variantes sustituidas de forma conservativa como se permite por el código genético.

Las variantes sustituidas de forma conservativa son secuencias de ácido nucleico que tienen sustituciones de codones degradados en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituyen con restos de base mixta y/o desoxiinosina. Véase Batzer y col. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5081; Ohtsuka y col. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; y Rossolini y col. (1994) *Mol. Cell Probes* 8:91-98.

Los ácidos nucleicos de la divulgación también comprenden ácidos nucleicos complementarios de una cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 48, o secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de región variable de A1, A2 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C, y subsecuencias y secuencias elongadas de SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 48, o secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de región variable de A1, A2 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C, y secuencias complementarias de las mismas. Son secuencias complementarias dos secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos antiparalelas capaces de emparejarse entre sí tras la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases. Como se usa en el presente documento, la expresión secuencias complementarias significa secuencias de nucleótidos que son sustancialmente complementarias, como se puede evaluar por los mismos procedimientos de comparación de nucleótidos expuestos posteriormente, o se define que son capaces de hibridar con el segmento de ácido nucleico en cuestión en condiciones relativamente rigurosas tales como las descritas en el presente documento. Un ejemplo particular de un segmento de ácido nucleico complementario es un oligonucleótido antisentido.

Una subsecuencia es una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una parte de una secuencia de ácido nucleico más larga. Una subsecuencia ejemplar es una sonda, descrita anteriormente en el presente documento, o un cebador. El término cebador como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia contigua que comprende aproximadamente 8 o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos preferentemente 10-20 nucleótidos, y más preferentemente 20-30 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico seleccionada. Los cebadores de la invención abarcan oligonucleótidos de longitud suficiente y secuencia apropiada para proporcionar el inicio de polimerización en una molécula de ácido nucleico en la presente divulgación.

Una secuencia elongada comprende nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) incorporadas en el ácido nucleico. Por ejemplo, una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa) puede añadir secuencias en el extremo 3' terminal de la molécula de ácido nucleico. Además, la secuencia de nucleótidos puede combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, regiones promotoras, potenciadores, señales de poliadenilación, secuencias intrónicas, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, y otros segmentos codificantes. Por lo tanto, la invención también proporciona vectores que comprenden los ácidos nucleicos desvelados, incluyendo vectores para expresión recombinante, en los que un ácido nucleico de la invención está unido operativamente con un promotor funcional. Cuando está unido operativamente con un ácido nucleico, un

promotor está en combinación funcional con el ácido nucleico de modo que la transcripción del ácido nucleico se controla y regula por la región promotora. Los vectores se refieren a ácidos nucleicos capaces de replicación en una célula huésped, tal como plásmidos, cósmidos y vectores virales.

5 Los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden clonarse, sintetizarse, alterarse, mutarse o combinaciones de los mismos. Se conocen en este campo técnicas de clonación molecular y de ADN recombinante convencionales usadas para aislar ácidos nucleicos. También se conoce en este campo mutagénesis específica para crear cambios, 5 delecciones o inserciones pequeñas de pares de bases. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (eds.) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Silhavy y col. (1984) *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; 10 Glover y Hames (1995) *DNA Cloning: A Practical Approach*, 2ª ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford/Nueva York; Ausubel (ed.) (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed. Wiley, Nueva York.

## II.B. Polipéptidos Anti-5T4

15 La presente invención también proporciona polipéptidos anti-5T4' aislados. Los polipéptidos y proteínas se refieren cada uno a un compuesto constituido por una única cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los polipéptidos de región variable de cadena pesada representativos se exponen como los restos 20-138 de SEC ID N°: 2, restos 20-141 de SEC ID N°: 10, y restos 1-119 de SEC ID N°: 49. Los polipéptidos de región variable de cadena ligera representativos se exponen como los restos 21-127 de SEC ID N°: 4, y los restos 21-127 de SEC ID N°: 12. Los polipéptidos adicionales de la invención comprenden aminoácidos de las regiones variables de A1 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

20 Los polipéptidos adicionales de la invención incluyen polipéptidos de región variable de cadena pesada y cadena ligera que son sustancialmente similares a los polipéptidos anti-5T4 desvelados, tal como al menos aproximadamente 90 % idénticos a las regiones variables de SEC ID N: 2, 4, 10, 12 y 49, por ejemplo, al menos aproximadamente 91 % idénticos, al menos 92 % idénticos, al menos 93 % idénticos, al menos 94 % idénticos, al menos 95 % idénticos, al menos 96 % idénticos, al menos 97 % idénticos, al menos 98 % idénticos o al menos 99 % 25 idénticos. Las secuencias se comparan con respecto a máxima correspondencia usando un algoritmo de comparación de secuencias usando la secuencia de longitud completa de una cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 10, 12, 49, o una cualquiera de las regiones variables de A1, A2 o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C como la secuencia de consulta, o la secuencia de región variable de la misma, o por inspección visual. La invención abarca además polipéptidos codificados por uno cualquiera de los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento. 30

35 Por ejemplo, los polipéptidos representativos de la invención incluyen (a) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % similar a los restos 20-138 de SEC ID N°: 2; (b) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 94 % similar a los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; (e) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % similar a los restos 20-141 de SEC ID N: 10; (f) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % similar a los restos 21-127 de SEC ID N°: 12; y (g) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % similar a los restos 1-119 de SEC ID N°: 49. Véase ejemplo 1 y Tabla 2, y ejemplo 7 y Tabla 11.

40 Los polipéptidos de la invención pueden comprender aminoácidos de origen natural, aminoácidos sintéticos, aminoácidos codificados genéticamente, aminoácidos no codificados genéticamente y combinaciones de los mismos. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos tanto de forma L como de forma D.

45 Los aminoácidos no codificados genéticamente representativos incluyen pero sin limitación ácido 2-aminoadípico; ácido 3-aminoadípico; ácido β-aminopropiónico; ácido 2-aminobutírico; ácido 4-aminobutírico (ácido piperidínico); ácido 6-aminocaproico; ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico; ácido 3-aminoisobutírico; ácido 2-aminopimélico; ácido 2,4-diaminobutírico; desmosina; ácido 2,2'-diaminopimélico; ácido 2,3-diaminopropiónico; N-etilglicina; N-etilaspargina; hidroxilisina; alo-hidroxilisina; 3-hidroxi prolina; 4-hidroxi prolina; isodesmosina; alo- 50 isoleucina; N-metilglicina (sarcosina); N-metilisoleucina; N-metilvalina; norvalina; norleucina; y ornitina.

55 Los aminoácidos derivatizados representativos incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que se han derivatizado grupos amino libres para formar clorhidratos de amina, grupos de p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, metil y etil ésteres u otros tipos de ésteres o hidrácidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de histidina puede derivatizarse para formar N-im- 60 benzilhistidina.

La presente invención también proporciona fragmentos de un polipéptido anti-5T4 de la invención, por ejemplo, fragmentos que constituyen un sitio de unión a antígeno 5T4. También se proporcionan secuencias polipeptídicas que son más largas que las secuencias desveladas. Por ejemplo, pueden añadirse uno o más aminoácidos al extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido de anticuerpo. Dichos aminoácidos adicionales pueden emplearse en una diversidad de aplicaciones, incluyendo pero sin limitación aplicaciones de purificación. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar proteínas elongadas. 65

Los polipéptidos anti-5T4 de la invención incluyen proteínas que comprenden aminoácidos que son variantes sustituidas de forma conservativa de una cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 10, 12 o 49. Una variante sustituida de forma conservativa se refiere a un polipéptido que comprende un aminoácido en el que uno o más restos se han sustituido de forma conservativa con un resto funcionalmente similar.

- 5 Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución con un resto no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina de otro; la sustitución con un resto polar (hidrófilo) de otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina; la sustitución con un resto básico tal como lisina, arginina o histidina de otro; o la sustitución con un resto ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, de otro.
- 10 Los polipéptidos aislados de la invención pueden purificarse y caracterizarse usando una diversidad de técnicas convencionales que se conocen por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, Schröder y Lübke (1965) *The Peptides*. Academic Press, Nueva York; Bodanszky (1993) *Principles of Peptide Synthesis*, 2ª rev. ed. Springer-Verlag, Berlín/Nueva York; Ausubel (ed.) (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed. Wiley, Nueva York.

#### II.C. Comparaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos

- 15 Las expresiones idéntico o porcentaje de identidad en el contexto de dos o más secuencias de nucleótidos o proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencia desvelados en el presente documento o por inspección visual.
- 20 La expresión sustancialmente idéntico con respecto a una secuencia de nucleótidos o proteica significa que una secuencia particular varía de la secuencia de una secuencia de origen natural en una o más deleciones, sustituciones o adiciones, cuyo efecto neto es conservar la función biológica de un ácido nucleico o polipéptido anti-5T4.

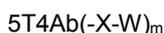
- 25 Para comparación de dos o más secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan una o más secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación se introducen secuencias de ensayo y de referencia en un programa informático, se designan coordenadas de subsecuencias si es necesario y se seleccionan parámetros de programas de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o las secuencias de ensayo designadas en relación con la secuencia de referencia basándose en los parámetros de programas seleccionados.
- 30

- Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math* 2:482-489, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de Software de Wisconsin Genetics, Computer Group, Madison, Wisconsin), o por inspección visual. Véase, en general, Ausubel (ed.) (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed. Wiley, Nueva York.
- 35

- Un algoritmo preferido para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Está disponible públicamente Software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los parámetros del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. Para la comparación de dos secuencias de nucleótidos, los parámetros por defecto de BLASTn se ajustan a W=11 (longitud de palabra) y E=10 (expectativa), y también incluyen el uso de un filtro de baja complejidad para enmascarar restos de la secuencia de consulta que tienen baja complejidad composicional. Para la comparación de dos secuencias de aminoácidos, los parámetros por defecto del programa BLASTp se ajustan a W=3 (longitud de palabra), E=10 (expectativa), uso de la matriz de puntuación BLOSUM62, costes de existencia de huecos=11 y extensión=1, y el uso de un filtro de baja complejidad para enmascarar restos de la secuencia de consulta que tiene baja complejidad composicional. Véase Ejemplo 1.
- 40
- 45

#### III. Conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco

- 50 La presente invención proporciona además conjugados de anticuerpo/fármaco que comprenden un anticuerpo anti-5T4 de la invención. También se proporcionan procedimientos para preparar los conjugados de anticuerpo/fármaco, de modo que el fármaco se une con el anticuerpo directa o indirectamente. Los conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención tienen la fórmula general



- 55 en la que:

5T4Ab es un anticuerpo anti-5T4 o fragmento de anticuerpo como se describe en el presente documento;

X es un engarce que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un anticuerpo anti-5T4 o fragmento de anticuerpo;

W es un fármaco;

5 m es la carga media para un producto de conjugación purificado (por ejemplo, m de modo que el fármaco constituya aproximadamente 3 - 10 % del conjugado en peso); y

(-X-W)<sub>m</sub> es un derivado farmacológico.

También se proporcionan procedimientos para preparar conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención. Como un ejemplo, puede prepararse un conjugado de anticuerpo/fármaco de la fórmula 5T4Ab(-X-W)<sub>m</sub> (a) añadiendo el derivado farmacológico al anticuerpo anti-5T4 siendo el fármaco 3-10 % en peso del anticuerpo anti-5T4; (b) incubando el derivado farmacológico y el anticuerpo anti-5T4 en una solución no nucleófila, compatible con proteínas, tamponada que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7 a 9 para producir un conjugado de anticuerpo/fármaco, en el que la solución comprende además (i) un codisolvente orgánico adecuado y (ii) y uno o más aditivos que comprenden al menos un ácido biliar o su sal, y en el que la incubación se realiza a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C durante un periodo de tiempo que varía de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas; y (c) sometiendo el conjugado producido en la etapa (b) a un procedimiento de separación cromatográfica para separar los conjugados de anticuerpo/fármaco con una carga en el intervalo de 3-10 % en peso del fármaco y con fracción conjugada baja (LCF) del anticuerpo anti-5T4 no conjugado, derivado farmacológico y conjugados agregados.

### 20 III.A. Fármacos

Un fármaco es cualquier sustancia que tenga actividad biológica detectable, por ejemplo, agente terapéuticos, marcadores detectables, agentes de unión, etc. y profármacos, que se metabolizan en un agente activo *in vivo*. Un fármaco también puede ser un derivado farmacológico, en el que un fármaco se ha funcionalizado para permitir la conjugación con un anticuerpo de la invención. En general, estos tipos de conjugados se denominan inmunoconjugados.

Los agentes terapéuticos son composiciones que pueden usarse para tratar o prevenir una afección en un sujeto que lo necesite. Los agentes terapéuticos útiles en la invención incluyen agentes antineoplásicos, es decir, agentes que tienen actividad antineoplásica en células que expresan 5T4 tales como células cancerosas de carcinoma de pulmón adenomatoso/escamoso (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de mama invasivo, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma de cuello uterino escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma de páncreas invasivo, carcinoma ovárico, carcinoma vesical escamoso y coriocarcinoma.

Los fármacos terapéuticos representativos incluyen citotoxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunomoduladores, agentes antiangiogénicos, agentes antiproliferativos, agentes proapoptóticos y enzimas citostáticas y citolíticas (por ejemplo, RNAsas). Un fármaco también puede incluir un ácido nucleico terapéutico, tal como un gen que codifica un agente inmunomodulador, un agente antiangiogénico, un agente antiproliferativo o un agente proapoptótico. Estos descriptores farmacológicos no son mutuamente excluyentes, y por tanto puede describirse un agente terapéutico usando uno o más de los términos anteriormente indicados. Por ejemplo, los radioisótopos seleccionados también son citotoxinas. Pueden prepararse agentes terapéuticos como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Generalmente, los conjugados que tienen un radioisótopo como el fármaco se denominan radioinmunoconjugados, y los que tienen un agente quimioterapéutico como el fármaco se denominan quimioinmunoconjugados.

Los ejemplos de fármacos adecuados para su uso en inmunoconjugados incluyen los taxanos, maitansinas, CC-1065 y las duocarmicinas, las caliqueamicinas y otros enodiinos, y las auristatinas. Otros ejemplos incluyen los antifolatos, alcaloides de la vinca y las antraciclinas. También pueden usarse toxinas vegetales, otras proteínas bioactivas, enzimas (es decir, ADEPT), radioisótopos, fotosensibilizadores (es decir, para terapia fotodinámica) en inmunoconjugados. Además, pueden realizarse conjugados usando vehículos secundarios como el agente citotóxico, tales como liposomas o polímeros, por ejemplo.

El término cito toxina generalmente se refiere a un agente que inhibe o previene la función de las células y/o da como resultado la destrucción de células. Las citotoxinas representativas incluyen antibióticos inhibidores de la polimerización de tubulina, agentes alquilantes que se unen con y alteran el ADN, y agentes que alteran la síntesis proteica o la función de proteínas celulares esenciales tales como proteína quinasas, fosfatasa, topoisomerasas, enzimas y ciclinas. Las citotoxinas representativas incluyen, pero sin limitación, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogarilo, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, encitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina, gougerotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazona, metotrexato, flurouracilos, etopósido, taxol, análogos del taxol, platinos tales como cis-platino y carbo-platino, mitomicina, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifeno, idarubicina, dolastatinas/auristatinas, hemisterlinas, esperamicinas y maitansinoides.

En realizaciones particulares de la invención, una citotoxina es un antibiótico tal como una caliqueamicina, también denominado el complejo LL-E33288, por ejemplo, gamma-caliqueamicina ( $\gamma_1$ ) o N-acetil gamma-caliqueamicina. Véase Patente de E.E.U.U N°: 4.970.198. Se desvelan ejemplos adicionales de caliqueamicinas adecuadas para su uso en la preparación de conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención en las Patentes de E.E.U.U N°: 4.671.958; 5.053.394; 5.037.651; 5.079.233; y 5.108.912 que se incorporan en el presente documento en su totalidad. Estos compuestos contienen un metiltrisulfuro que puede hacerse reaccionar con tioles apropiados para formar disulfuros, introduciendo al mismo tiempo un grupo funcional tal como una hidracida u otro grupo funcional que es útil para conjugar caliqueamicina con un anticuerpo anti-5T4. También pueden usarse análogos de disulfuro de caliqueamicina, por ejemplo, análogos descritos en las patentes de E.E.U.U N°: 5.606.040 y 5.770.710, que se incorporan en el presente documentos en su totalidad.

Para aplicaciones de radioterapia, un anticuerpo anti-5T4 de la invención puede comprender un radioisótopo de alta energía. El isótopo puede estar unido directamente con el anticuerpo, por ejemplo, en un resto de cisteína presente en el anticuerpo, o puede usarse un quelante para mediar en la unión del anticuerpo y el radioisótopo. Los radioisótopos adecuados para radioterapia incluyen pero sin limitación emisores  $\alpha$ , emisores  $\beta$  y electrones auger. Para aplicaciones de diagnóstico, los radioisótopos útiles incluyen emisores de positrones y emisores  $\gamma$ . Un anticuerpo anti-5T4 de la invención puede estar además yodado, por ejemplo, en un resto de tirosina del anticuerpo, para facilitar la detección o efecto terapéutico del anticuerpo.

Los radioisótopos representativos que pueden conjugarse con un anticuerpo anti-5T4 incluyen <sup>18</sup>fluor, <sup>64</sup>cobre, <sup>65</sup>cobre, <sup>67</sup>galio, <sup>68</sup>galio, <sup>77</sup>bromo, <sup>80m</sup>bromo, <sup>95</sup>rutenio, <sup>97</sup>rutenio, <sup>103</sup>rutenio, <sup>105</sup>rutenio, <sup>99m</sup>tecnecio, <sup>107</sup>mercurio, <sup>203</sup>mercurio, <sup>123</sup>yodo, <sup>124</sup>yodo, <sup>125</sup>yodo, <sup>126</sup>yodo, <sup>131</sup>yodo, <sup>133</sup>yodo, <sup>111</sup>indio, <sup>113</sup>indio, <sup>99m</sup>renio, <sup>105</sup>renio, <sup>101</sup>renio, <sup>186</sup>renio, <sup>188</sup>renio, <sup>121m</sup>telurio, <sup>99</sup>tecnecio, <sup>122m</sup>telurio, <sup>125m</sup>telurio, <sup>165</sup>tulio, <sup>167</sup>tulio, <sup>168</sup>tulio, <sup>90</sup>itrio, y formas de nitruro u óxido derivadas de los mismos. Otros radioisótopos adecuados incluyen emisores alfa, tales como <sup>213</sup>bismuto, <sup>213</sup>plomo y <sup>225</sup>actinio.

Los conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención pueden incluir inmunomoduladores, es decir, agentes que inducen una respuesta inmunitaria, incluyendo respuestas inmunitarias tumorales (por ejemplo, producción de anticuerpos específicos de antígeno) y respuestas inmunitarias medidas por células (por ejemplo, proliferación de linfocitos). Los agentes inmunomoduladores representativos incluyen citocinas, xantinas, interleucinas, interferones, y factores de crecimiento (por ejemplo, TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF), y hormonas tales como estrógenos (dietilestilbestrol, estradiol), andrógenos (testosterona, HALOTESTIN® (fluoximesterona)), progestinas (MEGACE® (acetato de megestrol), PROVERA® (acetato de medroxiprogesterona)), y corticosteroides (prednisona, dexametasona, hidrocortisona).

Los agentes inmunomoduladores útiles en la invención también incluyen antihormonas que bloquean la acción hormonal en tumores y agentes inmunosupresores que suprimen la producción de citocinas, regulan negativamente la expresión de autoantígenos o enmascaran los antígenos del MHC. Las antihormonas representativas incluyen antiestrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifeno; y antiandrógeno tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; y agentes antiadrenales. Los agentes inmunosupresores representativos incluyen 2-amino-6-aryl-5-sustituidas, azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído, anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC, ciclosporina A, esteroides tales como glucocorticosteroides, citocina o antagonistas del receptor de citocina (por ejemplo, anticuerpos anti-interferón, anticuerpos anti-IL10, anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , anticuerpos anti-IL2), estreptoquinasa, TGF $\beta$ , rapamicina, receptor de linfocitos T, fragmentos del receptor de linfocitos T y anticuerpos del receptor de linfocitos T.

Los fármacos adicionales útiles en la invención incluyen agentes antiangiogénicos que inhiben la formación de vasos sanguíneos, por ejemplo, inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores de COX-2, inhibidores de VEGF, inhibidores de bFGF, inhibidores de sulfatasa de esteroides (por ejemplo, 2-metoxiestradiol bis-sulfamato (2-MeOE2bisMATE)), interleucina-24, trombospondina, proteínas de metalospondina, interferones de clase I, interleucina 12, protamina, angiostatina, laminina, endostatina y fragmentos de prolactina.

Los agentes antiproliferativos y agentes proapoptóticos incluyen activadores de PPAR-gamma (por ejemplo, prostaglandinas de ciclopentenona (cyPG)), retinoides, triterpenoides (por ejemplo, cicloartano, lupano, ursano, oleanano, friedelano, dammarano, cucurbitacina y triterpenoides limonoides), inhibidores de receptor de EGF (por ejemplo, HER4), rampamicina, CALCITRIOL® (1,25-dihidroxycolcalciferol (vitamina D)), inhibidores de aromatasa (FEMARA® (letrozona)), inhibidores de telomerasa, quelantes de hierro (por ejemplo, 3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (Triapina)), apoptina (proteína viral 3 - VP3 de virus de anemia de pollo), inhibidores de Bcl-2 y Bcl-X(L), TNF-alfa, ligando FAS, ligando que induce la apoptosis relacionada con TNF (TRAIL/Apo2L), activadores de la señalización de TNF-alfa/ ligando FAS/ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL/Apo2L) e inhibidores de la ruta de supervivencia de PI3K-Akt (por ejemplo, UCN-01 y geldanamicina).

Los agentes quimioterapéuticos representativos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; azidinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, tietilenfosfo-

ramida, trietilfosforamida y trimetilolmelamina; mostazas del nitrógeno tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterinina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-EU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenal tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolnico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfofamina; demecolcina; diacicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2, 2', 2' - trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology of Princeton, Nueva Jersey) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer of Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; y capecitabina.

Los agentes terapéuticos adicionales que pueden conjugarse con anticuerpos anti-5T4 y usarse de acuerdo con los procedimientos terapéuticos de la presente invención incluyen agentes fotosensibilizadores (Publicación de Patente de E.E.U.U. N°: 2002/0197262 y Patente de E.E.U.U. N°: 5.952.329) para terapia foto dinámica; partículas magnéticas para termoterapia (Publicación de patente de E.E.U.U. N°: 2003/0032995); agentes de unión tales como péptidos, ligandos, ligandos de adhesión celular, etc., y profármacos tales como profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosulfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo.

Para procedimientos de diagnóstico usando anticuerpos anti-5T4, un fármaco puede comprender un marcador detectable usado para detectar la presencia de células que expresan 5T4 *in vitro* o *in vivo*. Los radioisótopos que son detectables *in vivo*, tales como los marcadores que son detectables usando escintigrafía, captura de imágenes por resonancia magnética o ultrasonidos, pueden usarse en aplicaciones de diagnóstico clínico. Los marcadores escintigráficos útiles incluyen emisores de positrones y emisores  $\gamma$ . Son agentes de contraste representativos para la captura de imágenes de fuente magnética los iones paramagnéticos o superparamagnéticos (por ejemplo, hierro, cobre, manganeso, cromo, erbio, europio, disprosio, holmio y gadolinio), partículas de óxido de hierro y agentes de contraste solubles en agua. Para la detección ultrasónica, pueden inmovilizarse gases o líquidos en partículas inorgánicas porosas que se liberan como agentes de contraste de microburbujas. Para la detección *in vitro*, los marcadores detectables útiles incluyen fluoróforos, epítomos detectables o agentes de unión y marcadores radiactivos.

### III.B. Moléculas de engarce

Los fármacos se conjugan con anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados de la invención directa o indirectamente mediante una molécula de engarce. La molécula de engarce puede ser estable o hidrolizable, por lo que se libera después de la entrada celular. Los mecanismos principales por los que el fármaco se escinde del anticuerpo incluyen hidrólisis en el pH ácido de los lisosomas (hidrazonas, acetales, y amidas de tipo cis-aconitato), escisión peptídica por enzimas lisosómicas (las catepsinas y otras enzimas lisosómicas) y reducción de disulfuros. Como resultado de estos diversos mecanismos de escisión, los mecanismos de enlace del fármaco con el anticuerpo también variarán ampliamente y puede usarse cualquier engarce adecuado. Preferentemente, el procedimiento de conjugación produce una muestra con fracción conjugada baja mínima (LCF, la fracción de anticuerpo principalmente no conjugado), es decir, menos de aproximadamente el 10 %.

Un ejemplo de un procedimiento de conjugación adecuado se basa en la conjugación de hidracidas y otros nucleófilos con los aldehídos generados por oxidación de los carbohidratos que aparecen de forma natural en los anticuerpos. Pueden prepararse conjugados que contienen hidrazona con grupos carbonilo introducidos que proporcionan las propiedades de liberación de fármacos deseadas. También pueden prepararse conjugados con un engarce que tiene un disulfuro en un extremo, una cadena de alquilo en el medio y un derivado de hidracina en el otro extremo. Las antraciclinas son un ejemplo de citotoxinas que pueden conjugarse con anticuerpos usando esta tecnología.

Los engarces que contienen grupos funcionales distintos de hidrazonas tienen el potencial de escindirse en el medio ácido de los lisosomas. Por ejemplo, pueden prepararse conjugados a partir de engarces reactivos con tiol que contienen un sitio distinto de una hidrazona que es escindible de forma intracelular, tales como ésteres, amidas y acetales/cetales. La camptotecina es un agente citotóxico que puede conjugarse usando estos engarces. También pueden usarse cetales compuestos de un anillo de cetona de 5 a 7 miembros y que tiene uno de los oxígenos unido con el agente citotóxico y el otro con un engarce para la unión con el anticuerpo. Las antraciclinas también son un ejemplo de una citotoxina adecuada para su uso con estos engarces.

Otro ejemplo de una clase de engarces sensibles al pH son los cis-aconitatos, que tienen un ácido carboxílico yuxtapuesto con un enlace amida. El ácido carboxílico acelera la hidrólisis de amida en los lisosomas ácidos. También pueden usarse engarces que consiguen un tipo similar de aceleración de la velocidad de hidrólisis con varios otros tipos de estructuras. Los maitansinoides son un ejemplo de una citotoxina que puede conjugarse con engarces unidos en C-9.

Otro procedimiento de liberación potencial para conjugados farmacológicos es la hidrólisis enzimática de péptidos por las enzimas lisosómicas. En un ejemplo, un péptido se une mediante un enlace amida con alcohol para-aminobencílico y después se prepara un carbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y el agente citotóxico. La escisión del péptido conduce al colapso, o autoinmolación del carbamato o carbonato de aminobencilo. En un ejemplo, también puede liberarse un fenol por colapso del engarce en lugar del carbamato. En otra variación, se usa reducción de disulfuro para iniciar el colapso de un carbamato o carbonato de paramercaptobencilo.

Muchos de los agentes citotóxicos conjugados con los anticuerpos tiene poca solubilidad, si la tienen, en agua y eso puede limitar la carga farmacológica en el conjugado debido a la agregación del conjugado. Un enfoque para superar esto es añadir grupos solubilizantes al engarce. Pueden usarse conjugados realizados con un engarce consistente en PEG y un dipéptido, incluyendo los que tienen un diácido, tiol-ácido o maleimida-ácido de PEG unido con el anticuerpo, un espaciador dipeptídico, y un enlace amida con la amina de una antraciclina o un análogo de duocarmicina. Otro ejemplo es un conjugado preparado con un engarce que contiene PEG unido por enlace disulfuro con un agente citotóxico y unido por enlace amida con un anticuerpo. Los enfoques que incorporan grupos de PEG pueden ser beneficios para superar la agregación y los límites en la carga farmacológica.

Los engarces representativos preferidos para la preparación de conjugado de anticuerpo/fármaco de la invención incluyen engarces de la fórmula:



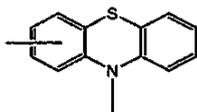
en la que

Alk<sup>1</sup> y Alk<sup>2</sup> son de forma independiente un enlace o cadena de alquileo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) ramificada o no ramificada; Sp<sup>1</sup> es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR'-, -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N-, o -X-Ar'-Y-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Z en el que X, Y y Z son de forma independiente un enlace, -NR'-, -S-, u -O-, a condición de que cuando n = 0, entonces al menos uno de Y y Z debe ser un enlace y Ar' es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), alkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', a condición de que cuando Alk<sup>1</sup> es un enlace, Sp<sup>1</sup> es un enlace;

n es un número entero de 0 a 5;

R' es una cadena ramificada o no ramificada (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) opcionalmente sustituida por uno o dos grupos de -OH, alkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, dialquilamino (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), o trialkilamonio (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)-A' en la que A' es un anión farmacéuticamente aceptable que completa una sal;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR' en el que n y R' son como se ha definido anteriormente en el presente documento o un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2,7-naftilideno o



con cada naftilideno o fenotiazina opcionalmente sustituido con uno, dos, tres o cuatro grupos de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR' en el que n y R' son como se ha definido anteriormente a condición de que cuando Ar es fenotiazina, Sp<sup>1</sup> es un enlace conectado solamente con nitrógeno;

Sp<sup>2</sup> es un enlace, -S-, u -O-, a condición de que cuando Alk<sup>2</sup> es un enlace, Sp<sup>2</sup> es un enlace;

Z<sup>1</sup> es H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), alkoxi, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, -COOR', -ONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR' en el que n y R' son como se ha definido anteriormente;

Sp es un radical divalente o trivalente (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>) de cadena sencilla o ramificada, radical de arilo o heteroarilo

divalente o trivalente, radical de cicloalquilo o heterocicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>) divalente o trivalente, radical de aril- o heteroaril-arilo (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>) divalente o trivalente, radical de cicloalquil o heterocicloalquil-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>) divalente o trivalente o radical de alquilo insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>) divalente o trivalente, en el que el heteroarilo es preferentemente furilo, tienilo, N-metilpirrolilo, piridinilo, N-metilimidazolilo, oxazolilo, pirimidinilo, quinolilo, isoquinolilo, N-metilcarbazoilo, aminocourmarinilo, o fenazinilo y en el que si Sp es un radical trivalente, Sp puede sustituirse adicionalmente por dialquilamino (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) inferior, alkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) inferior, hidroxilo o grupos alquiltio (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) inferiores; y  
Q es =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH-, o =NHO-.

Preferentemente, Alk<sup>1</sup> es una cadena de alquileo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) ramificada o no ramificada; Sp' es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, o -NR' en el que R' es como se ha definido anteriormente en el presente documento a condición de que cuando Alk<sup>1</sup> es un enlace, Sp<sup>1</sup> es un enlace;

Ar es 1,2-, 1,3-, o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR' en el que n y R' son como se ha definido anteriormente en el presente documento, o Ar es un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2,7- nafilideno cada uno opcionalmente sustituido con uno, dos, tres o cuatro grupos de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alkoxi, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR'.

Z<sup>1</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), alkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), tioalkoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR', -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR', o -S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CONHR'; Alk<sup>2</sup> y Sp<sup>2</sup> son juntos un enlace; y Sp y Q son como se ha definido inmediatamente antes.

La Patente de E.E.U.U N°: 5.773.001, incorporada en el presente documento en su totalidad, desvela engarces que pueden usarse con fármacos nucleófilos, particularmente hidracidas y nucleófilos relacionados, preparados a partir de las caliqueamicinas. Estos engarces son especialmente útiles en casos en los que se obtiene mejor actividad cuando el enlace formado entre el fármaco y el engarce es hidrolizable. Estos engarces contienen dos grupos funcionales, incluyendo (1) un grupo para reacción con un anticuerpo (por ejemplo, ácido carboxílico), y (2) un grupo carbonilo (por ejemplo, un aldehído o una cetona) para reacción con un fármaco. Los grupos carbonilo pueden reaccionar con un grupo hidracida en el fármaco para formar un enlace de hidrazona. Este enlace es hidrolizable, permitiendo la liberación del agente terapéutico del conjugado después de la unión con las células diana.

Como un ejemplo, puede conjugarse un anticuerpo anti-5T4 con un fármaco citotóxico (1) añadiendo el derivado de fármaco citotóxico al anticuerpo anti-5T4 en el que el fármaco citotóxico es 4,5 %-11 % en peso del vehículo proteico; (2) incubando el derivado de fármaco citotóxico y anticuerpo anti-5T4 en una solución no nucleófila, compatible con proteínas, tamponada que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7 a 9 para producir un conjugado de fármaco citotóxico monomérico/anticuerpo, en el que la solución comprende además (a) un codisolvente orgánico adecuado y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> o su sal, y en el que la incubación se realiza a una temperatura que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C durante un periodo de tiempo que varía de aproximadamente 15 minutos a 24 horas; y (3) sometiendo el conjugado producido en la etapa (2) a un procedimiento de separación cromatográfica para separar conjugados monoméricos con una carga en el intervalo de 3 % a 10 % en peso de fármaco citotóxico y con fracción conjugada baja (LCF) por debajo del 10 % de anticuerpo no conjugado, derivado de fármaco citotóxico y conjugados agregados.

La separación cromatográfica de la etapa (3) puede incluir procedimientos tales como cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), ultrafiltración/diafiltración, HPLC, FPLC, o cromatografía de Sephacryl S-200. La separación cromatográfica también puede conseguirse por cromatografía de integración hidrófoba (HIC) usando medio cromatográfico Fast Flow de fenil Sepharose, medio cromatográfico Fast Flow de butil Sepharose 4, medio cromatográfico Fast Flow de Octil Sepharose 4, medio cromatográfico Toyopearl Ether-650M, medio de Macro-Prep metil HIC o medio de Macro-Prep t-Butil HIC.

Los procedimientos representativos para preparar conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco incluyen los descritos para la preparación de CMC-544 en la Publicación de Solicitud de Patente de E.E.U.U publicada en trámite junto con la presente N°: 2004-082764A1 y la solicitud de patente de E.E.U.U N°: 10/699.874, que se incorporan en el presente documento en su totalidad. Puede realizarse conjugación usando las siguientes condiciones: anticuerpo 10 mg/ml, derivado de caliqueamicina 8,5 % (p/p), decanoato sódico 37,5 mM, etanol 9 % (v/v), HEPES (N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 4-butanosulfónico)), 50mM, pH 8,5, 32 °C, 1 hora. Puede realizarse cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina de butil sepharose FF, tampón de carga de fosfato potásico 0,65 M, tampón de lavado de fosfato potásico 0,49 M y tampón de elusión de fosfato potásico 4 mM. Puede conseguirse intercambio de tampón por cromatografía de exclusión por tamaño, ultrafiltración/diafiltración u otro medio adecuado. El conjugado de anticuerpo/fármaco puede formularse en Dextrano-40 1,5 %, sacarosa 0,9 %, TWEEN®-80, 0,01 %, Tris 20 mM/NaCl 50 mM, pH 8,0. También puede usarse una solución de formulación alternativa que contiene sacarosa al 5 %, TWEEN®-80 0,01 %, Tris 20 mM/NaCl 10 mM, pH 8,0. Los ciclos de liofilización se ajustan basándose en la formulación. La concentración del volumen formulado puede ser de 0,5 mg de conjugado/ml. Cada frasco puede contener 1 mg de conjugado, es decir, 2 ml de carga. Pueden prepararse otros volúmenes de carga según se desee, por ejemplo, 5 ml de carga.

Otros procedimientos representativos incluyen los descritos para CMD-193, también descritos en la Publicación de solicitud de Patente de E.E.U.U. N°: 20060002942. Puede realizarse conjugación usando las siguientes condiciones: anticuerpo 10 mg/ml, derivado de caliqueamicina 7 % (p/p), desoxicolato 10 mM, HEPBS (N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(4-ácido butanosulfónico)) 50 mM, etanol 9 % (v/v), pH 8,2, 32 °C, 1 hora. La reacción puede diluirse 10 veces con fosfato potásico 0,66 M pH 8,56, y puede realizarse HIC usando una resina de butil sepharose FF, tampón de carga de fosfato potásico 0,60 M y tampón de lavado, y tampón de elución de Tris 20 mM/NaCl 25 mM. Puede conseguirse intercambio de tampón usando ultrafiltración/diafiltración con una membrana de celulosa regenerada. El conjugado puede diafiltrarse contra Tris 20 mM/NaCl 10 mM pH 8,0 (10 diavolumenes). El conjugado de anticuerpo/fármaco puede formularse en sacarosa 5 %, TWEEN®-80 0,01 %, Tris 20 mM/NaCl 10 mM, pH 8,0. La concentración del conjugado a granel después de la formulación puede ser de 1 mg/ml, y la carga del frasco puede ser de 5 mg/frasco, es decir, 5 ml de carga, o pueden prepararse otros volúmenes de carga según se desee.

En una realización particular de la invención, el engarce empleado es ácido 4-(4-acetilfenoxi) butanoico (AcBut). Se preparan conjugados de anticuerpo/fármaco haciendo reaccionar  $\beta$ -caliqueamicina,  $\gamma$ -caliqueamicina o N-acetil  $\gamma$ -caliqueamicina, o derivados de los mismos, con 3-mercapto-3-metil butanoil hidracida, el engarce AcBut y un anticuerpo anti-5T4 de la invención. Véase por ejemplo, Patente de E.E.U.U. N°: 5.773.001. Este engarce produce conjugados que son sustancialmente estables en circulación, liberando una estimación del 2 % del NAc-gamma DMH por día, y que liberan el NAc-gamma DMH fácilmente en los lisosomas ácidos. En otras realizaciones de la invención, se preparan conjugados de anticuerpo/fármaco usando ácido 3-acetilfenilo ácido (AcPac) o ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida) como la molécula de engarce.

Los engarces representativos útiles para la conjugación de radioisótopos incluyen isotiocianato de dietilentriamina pentaacetato (DT-PA), clorhidrato de succinimidil 6-hidracinio nicotinato (SHNH), y hexametilpropilen amina oxima (HMPAO) (Bakker y col. (1990) J. Nucl. Med. 31: 1501-1509, Chattopadhyay y col. (2001) Nucl. Med. Biol. 28: 741-744, Dewanjee y col. (1994) J. Nucl. Med. 35: 1054-63, Krenning y col. (1989) Lancet 1: 242-244, Sagiuchi y col. (2001) Ann. Nucl. Med. 15: 267-270); Patente de E.E.U.U. N°: 6.024.938). Como alternativa, una molécula de dirección puede derivatizarse de modo que un radioisótopo pueda unirse directamente con ella (Yoo y col. (1997) J. Nucl. Med. 38: 294-300). También se conocen en la técnica procedimientos de yodación, y pueden encontrarse protocolos representativos, por ejemplo, en Krenning y col. (1989) Lancet 1:242-4 y en Bakker y col. (1990) J. Nucl. Med. 31:1501-9.

Para aumentar adicionalmente el número de moléculas farmacológicas por conjugado de anticuerpo/fármaco, el fármaco puede conjugarse con polietilenglicol (PEG), incluyendo polímeros y monómeros de polietilenglicol sencillos o ramificados. Un monómero de PEG tiene la fórmula:  $-(CH_2CH_2O)-$ . Pueden unirse fármacos y/o análogos peptídicos con PEG directa o indirectamente, es decir mediante grupos espaciadores apropiados tales como azúcares. Una composición de PEG/anticuerpo/fármaco también puede incluir restos lipófilos y/o hidrófilos adicionales para facilitar la estabilidad farmacológica y la administración a un sitio diana *in vivo*. Pueden encontrarse procedimientos representativos para preparar composiciones que contienen PEG en las Patentes de E.E.U.U N°: 6.461.603; 6.309.633; y 5.648.095, entre otros sitios.

Por ejemplo, para aumentar la cantidad de caliqueamicina en conjugados de anticuerpo-caliqueamicina, el anticuerpo se conjuga con PEG antes de la conjugación con caliqueamicina, por ejemplo, usando PEG-SPA, PEG-SBA, o PEG-bis-maleimida. Los conjugados de anticuerpo/fármaco preparados usando PEG pueden mostrar afinidad de unión reducida por el antígeno diana, pero aún ser eficaces como resultado de la carga farmacológica aumentada. Pueden usarse aditivos tales como desoxicolato y decanoato para producir un conjugado de anticuerpo/caliqueamicina con niveles bajos de anticuerpo y niveles bajos de agregado.

La naturaleza hidrófoba de muchos fármacos, incluyendo caliqueamicinas, puede dar como resultado la agregación de conjugados de anticuerpo/fármaco. Para producir conjugados de anticuerpo/fármaco monoméricos con mayor carga/rendimiento de fármacos y agregación reducida, la reacción de conjugación puede realizarse en una solución no nucleófila, compatible con proteínas, tamponada que contiene (i) propilenglicol común codisolvente y (ii) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico  $C_6$ - $C_{18}$ . Los ácidos útiles incluyen ácidos  $C_7$  a  $C_{12}$ , tales como ácido octanoico o ácido caprílico, o sus sales. También pueden usarse otros codisolventes orgánicos compatibles con proteína distintos de propilenglicol, tales como etilenglicol, etanol, DMF, DMSO, etc. Se usan algunos de o todos los codisolventes orgánicos para transferir el fármaco a la mezcla de conjugación. Los tampones útiles para la preparación de conjugados de anticuerpo/fármaco usando ésteres de N-hidroxisuccinimida (OSu) u otros ésteres comparablemente activados incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS) y ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES). La solución tamponada usada en reacciones de conjugación debería carecer sustancialmente de aminas libres y nucleófilos. Como otro enfoque, las reacciones de conjugación pueden realizarse en una solución no nucleófila, compatible con proteínas, tamponada que contiene t-butanol sin los aditivos adicionales. Véase por ejemplo, Patentes de E.E.U.U N°: 5.712.374 y 5.714.586. Se describen procedimientos adicionales para la conjugación y conjugados que contienen caliqueamicina en las Patentes de E.E.U.U N°: 5.739.116 y 5.877.296.

Las condiciones de reacción óptimas para la formación de un conjugado monomérico pueden determinarse de forma empírica por la variación de variables de reacción tales como la temperatura, pH, aporte de derivado de

caliqueamicina y concentración de aditivos. Las cantidades representativas de propilenglicol varían del 10 % al 60 %, por ejemplo, del 10 % al 40 %, o aproximadamente el 30 % en volumen de la solución total. Las cantidades representativas de un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> o su sal varían de 20 mM a 100 mM, tal como de 40 mM a 90 mM, o de aproximadamente 60 mM a 90 mM. La concentración del ácido carboxílico C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> o su sal puede aumentarse hasta 150-300 mM y el codisolvente reducirse del 1 % al 10 %. En realizaciones representativas de la invención, el ácido carboxílico es ácido octanoico, ácido decanoico o las sales correspondientes. Por ejemplo, puede usarse ácido caprílico 200 mM con propilenglicol o etanol 5 %. La reacción de conjugación puede realizarse a temperatura (30-35 °C) y pH (8,2-8,7) ligeramente elevados. La concentración de anticuerpo puede variar de 1 a 15 mg/ml y la concentración de un derivado de caliqueamicina, por ejemplo, N-Acetil gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu éster puede variar de aproximadamente el 4,5 % al 11 % en peso del anticuerpo. Pueden determinarse condiciones adecuadas para la conjugación de otros fármacos por los expertos en la materia sin experimentación indebida.

### III.C. Purificación de conjugados de anticuerpo/fármaco

Después de la conjugación, los conjugados monoméricos pueden separarse de reactivos no conjugados y/o formas agregadas de los conjugados por procedimientos convencionales, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), o cromatofoque (CF). Los conjugados purificados son monoméricos y habitualmente contienen del 3 % al 10 % de fármaco en peso. También pueden purificarse conjugados de anticuerpo/fármaco usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), que ofrece algunas ventajas sobre SEC incluyendo (1) una capacidad para reducir eficazmente el contenido de LCF así como agregado; (2) alojamiento de volúmenes de reacción grandes; y (3) dilución mínima del producto. Los medios de HIC de alta capacidad adecuados para su uso en escala de producción incluyen medio cromatográfico de Fenil Sepharose 6 Fast Flow, medio cromatográfico de Butil Sepharose 4 Fast Flow, medio cromatográfico de Octil Sepharose 4 Fast Flow, medio cromatográfico de Eter-650M Toyopearl, medio de HIC macro-Prep metilo o medio de HIC macro-prep-t butilo. También puede usarse ultrafiltración/diafiltración para intercambio de tampones.

En un procedimiento de purificación representativo, se realizan múltiples etapas, incluyendo una etapa de retirada de células de centrifuga, una etapa de captura de afinidad de proteína A seguida de una o dos etapas de pulido cromatográfico ortogonal, una etapa de filtración de virus y una etapa de filtración de flujo tangencial para concentración y formulación. El procedimiento de purificación produce preferentemente producto con menos del 5 % de agregado, menos de 20 ppm de proteína A, menos de 50 ppm de proteína de la célula huésped y una recuperación general de más del 50 %.

Una preparación de anti-5T4/caliqueamicina típica contiene predominantemente (aproximadamente 95 %) anticuerpo conjugado que contiene 5-7 moles de caliqueamicina por mol de anticuerpo. El conjugado se ha preparado de forma reproducible a la escala de laboratorio (10-200 mg). La carga farmacológica, que se expresa como µg de caliqueamicina/mg de anticuerpo monoclonal, se determina dividiendo la concentración de caliqueamicina (mg/ml) por la concentración de anticuerpo (mg/ml). Estos valores se determinan midiendo la absorbancia de UV de la solución de conjugado a 280 nm y 310 nm. Es importante observar que esta es una carga media y que la carga real es una distribución casi gaussiana centrada en el valor de carga medio, es decir, algo del anticuerpo se carga a más que la media y algo del anticuerpo se carga a menos que la media. El anticuerpo no conjugado (fracción conjugada baja), que puede medirse usando HIC-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de interacción hidrófoba) analítica, es la población de anticuerpo que tiene poca o ninguna caliqueamicina conjugada. Este valor es una medida de la distribución de caliqueamicina en el anticuerpo y no afecta en general a la cantidad de caliqueamicina dosificada. La caliqueamicina no conjugada, que puede medirse usando ELISA, se refiere a la cantidad de caliqueamicina que no se conjuga con el anticuerpo y se expresa con respecto al porcentaje de caliqueamicina total. Los ensayos de carga farmacológica no diferencian entre caliqueamicina no conjugada y conjugada. La cantidad de caliqueamicina no conjugada es indetectable o despreciable cuando se usan ensayos de carga farmacológica, y por lo tanto estos ensayos miden eficazmente la cantidad de caliqueamicina conjugada.

Puede usarse procedimientos analíticos para ensayar con respecto a la liberación y estabilidad de conjugados de caliqueamicina y anti-5T4 humanizado. Los conjugados pueden evaluarse con respecto a identidad (IEF), fuerza (carga de proteína total y caliqueamicina total), pureza (caliqueamicina no conjugada, anticuerpo conjugado bajo, contenido agregado y SDS-PAGE reducido), e inmunoafinidad (ELISA reunión al antígeno). Pueden usarse ensayos adicionales conocidos por los expertos en la materia. Usando estos ensayos, puede conseguirse uniformidad entre lotes en la fabricación comercial.

### III.D. Farmacocinética de los conjugados de anticuerpo/fármaco

Puede evaluarse la farmacocinética de inmunoconjugados dirigidos a 5T4 y compararse con la farmacocinética de caliqueamicina no conjugada en diversos animales. Por ejemplo, esto puede realizarse después de una única administración de embolada intravenosa en ratones desnudos hembra, ratas Sprague-Dawley macho y monos cynomolgus hembra. La farmacocinética de un anticuerpo anti-5T4 se caracteriza en general por baja eliminación, bajo volumen de distribución y larga semivida terminal aparente en diversas especies. Se espera que las concentraciones en suero de derivados de caliqueamicina no conjugados estén por debajo del límite de

cuantificación. Se espera que el perfil de toxicidad para estos conjugados en estudios de variación de toxicidad de una única dosis sea similar al obtenido para otros conjugados de anticuerpo/caliqueamicina a dosis comparables.

#### IV. Ensayos funcionales para caracterización de anticuerpos Anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco

5 La presente invención desvela además ensayos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar actividades de un anticuerpo anti-5T4, incluyendo la actividad de unión de 5T4, la internalización celular después de la unión con el antígeno 5T4 presentado en una superficie celular, y la dirección a células que expresan 5T4 en un sujeto. Cuando se conjugan con una citotoxina, los anticuerpos desvelados de la invención pueden inducir actividad antineoplásica incluyendo inhibición del crecimiento de células cancerosas que expresan 5T4 y/o inducción de la muerte celular en células que expresan 5T4. Los anticuerpos anti-5T4 de la invención pueden comprender una o más de las actividades anteriores.

15 Se conocen en este campo técnicas para detectar la unión de anticuerpos anti-5T4 con antígeno 5T4, incluyendo por ejemplo, ensayos BIACORE® como se describe en el Ejemplo 2. Las técnicas representativas adicionales incluyen centrifugación, cromatografía de afinidad y otros procedimientos inmunoquímicos. Véase por ejemplo, Manson (1992) *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos de América; Ishikawa (1999) *Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay*, Elsevier, Ámsterdam/Nueva York. Pueden realizarse ensayos de unión a antígeno usando antígeno 5T4 aislado o células que expresan 5T4. Véase Ejemplo 2.

La especificidad de unión de los anticuerpos anti-5T4 puede describirse adicionalmente por la definición de un epítipo de unión, es decir, identificación de restos, incluyendo restos no adyacentes que participan en la unión a antígeno y/o definición de restos que influyen en la unión a antígeno. Véase los Ejemplos 4-5.

20 Puede ensayarse la internalización de los anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco por células que expresan 5T4 observando la cantidad de anticuerpos o conjugados unidos con la superficie de las células que expresan 5T4 a lo largo del tiempo. Se describen técnicas representativas para evaluar la localización en membrana de anticuerpos y conjugados de anticuerpo/fármaco en el Ejemplo 3.

25 Los ensayos funcionales también incluyen procedimientos para evaluar la actividad antineoplásica de conjugados de anticuerpo/fármaco, por ejemplo, una capacidad para destruir células cancerosas existentes, o para retardar o prevenir el crecimiento de células cancerosas. Los cánceres a los que se dirigen conjugados de anticuerpo/fármaco incluyen tumores tanto primarios como metastatizados y carcinomas de cualquier tejido en un sujeto, incluyendo carcinomas y tumores malignos hematopoyéticos tales como leucemias y linfomas.

30 Los anticuerpos anti-5T4 que tienen actividad inhibidora del crecimiento pueden eliminar células que expresan 5T4 o prevenir o reducir la proliferación de células que expresan 5T4. Se describen procedimientos representativos para evaluación *in vitro* rápida de la inhibición del crecimiento celular en Jones y col. (2001) *J. Immunol. Methods* 254:85-98.

35 Los anticuerpos anti-5T4 también pueden comprender una capacidad para inducir la muerte celular, por ejemplo, muerte celular programada caracterizada por la degradación de ADN nuclear, degeneración y condensación nuclear, pérdida de integridad de membrana y fagocitosis. Se describen ensayos representativos para evaluar las células en Hoves y col. (2003) *Methods* 31:127-34; Peng y col. (2002) *Chin. Med. Sci. J.* 17:17-21; Yasuhara y col. (2003) *J. Histochem. Cytochem.* 51:873-885.

40 Por ejemplo, para evaluar la citotoxicidad de conjugados de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina *in vitro*, se cultivan células MDAMB435/5T4 (células de carcinoma de mama humano que sobreexpresan el antígeno 5T4) y células MDAMB435/neo (células de control) en presencia de conjugados de anticuerpo-caliqueamicina o caliqueamicina libre, esencialmente como se describe en Boghaert y col. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10: 4538-4549. La citotoxicidad de cada agente se presenta como DE50 (ng/ml), que es la cantidad de caliqueamicina proporcionada como conjugado o como fármaco libre que provoca la reducción del 50 % de un cultivo celular en relación con un control no tratado. El número de células en cultivo se determina usando un colorante vital (MTS) después de exposición al fármaco. Véase también Ejemplo 6.

50 La citotoxicidad de conjugados de anticuerpo/caliqueamicina también puede evaluarse usando células MDAMB435/5T4 y MDAMB435/neo cultivadas de una manera adecuada para el crecimiento esferoide. Las células se cultivan en presencia de conjugados de anticuerpo/caliqueamicina o caliqueamicina libre, y después de exposición al fármaco, se determinaron las dimensiones de cada esferoide. La eficacia de cada uno de los agentes en la inhibición del crecimiento esferoide se presenta como DE50 (ng/ml), es decir, la cantidad de caliqueamicina proporcionada como conjugado o como fármaco libre que provoca el 50 % de inhibición del crecimiento esferoide en relación con un control no tratado. Véase Ejemplo 6.

55 Para evaluar la citotoxicidad de conjugados de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina *in vivo*, se preparan tumores en ratones desnudos por inyección subcutánea de células MDAMB435/5T4 (células de carcinoma de mama humano que sobreexpresan el antígeno 5T4), células NCI-H157 (células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano), células PC14PE6 (células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano), o células N87 (células de carcinoma gástrico). Se administran conjugados de anticuerpo/caliqueamicina y compuestos de control a ratones

portadores de tumores, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal en un total de tres dosis proporcionadas a intervalos de 4 días, por ejemplo, los días 1, 5 y 9. Los resultados terapéuticos medibles incluyen la inhibición del crecimiento de células tumorales.

5 Para evaluar adicionalmente la capacidad de dirección de conjugados de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina, se puede usar un modelo ortotópico para cáncer de células no pequeñas y células pequeñas, esencialmente como se describe en Onn y col. (2003) Clin. Cancer Res. 9(15):5532-5539. Brevemente, se inyectan células de adenocarcinoma de pulmón humano (PC14PE6) en venas de la cola de ratones desnudos, que después migran para formar tumores en el pulmón. Los tumores pueden aparecer como nódulos sólidos en el parénquima del pulmón y provocan efusiones pleurales hemorrágicas que contienen células tumorales suspendidas. Se administran compuestos de control y conjugados de anticuerpo/caliqueamicina a ratones portadores de tumores, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal comenzando a los 6 días después de la inyección de células tumorales durante un total de 3 dosis proporcionadas a intervalos de 4 días, por ejemplo, los días 6, 10 y 14. Los resultados terapéuticos medibles incluyen efusiones pleurales reducidas y aumento de la supervivencia.

#### V. Usos de anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco

15 Los anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención son útiles tanto *in vitro* como *in vivo* para aplicaciones relacionadas con células que expresan 5T4. Los cánceres que expresan 5T4 incluyen carcinoma de pulmón escamoso/adenomatoso (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de mama invasivo, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma del cuello uterino escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma de páncreas invasivo, carcinoma ovárico, carcinoma vesical escamoso y coriocarcinoma. Se detecta 5T4 en carcinomas de bronquios, mama, colon, recto, estómago, cuello uterino, endometrio, páncreas, ovarios, corion y vesículas seminales.

#### V.A. Aplicaciones *In Vitro*

La presente divulgación proporciona procedimientos *in vitro* usando anticuerpos anti-5T4. Por ejemplo, los anticuerpos desvelados pueden usarse solos o en combinación con agentes citotóxicos u otros fármacos para unirse específicamente con células cancerosas positivas para 5T4 para agotar dichas células de una muestra celular. También se proporcionan procedimientos para inducir apoptosis y/o inhibición de la proliferación celular mediante el contacto de células que expresan 5T4 con un conjugado de anticuerpo/fármaco que comprende un anticuerpo anti-5T4 conjugado con una citotoxina. Se han descrito en el presente documento procedimientos *in vitro* representativos anteriormente bajo el encabezamiento de "Ensayos funcionales para Caracterización de anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco."

Los anticuerpos Anti-5T4 de la invención también tienen utilidad en la detección de células positivas para 5T4 *in vitro* basándose en su capacidad para unirse específicamente con el antígeno 5T4. Un procedimiento para detectar células que expresan 5T4 puede comprender: (a) preparar una muestra biológica que comprende células; (b) poner en contacto un anticuerpo anti-5T4 con la muestra biológica *in vitro*; y (c) detectar la unión del anticuerpo anti-5T4. Para facilitar la detección, el anticuerpo puede conjugarse con un marcador.

#### V.B. Detección y Diagnóstico *In Vivo*

También pueden usarse anticuerpos anti-5T4 de la invención para procedimientos de detección *in vivo*, por ejemplo, según sea útil para el diagnóstico, para proporcionar asistencia intraoperatoria, o para la determinación de la dosis. Después de la administración de un anticuerpo anti-5T4 marcado a un sujeto, y después de un tiempo suficiente para la unión, puede visualizarse la biodistribución de células que expresan 5T4 unidas por el anticuerpo. Los procedimientos de diagnóstico desvelados pueden usarse en combinación con procedimientos de tratamiento. Además, los anticuerpos anti-5T4 de la invención pueden administrarse para el fin doble de detección y terapia.

Los procedimientos de detección no invasivos representativos incluyen escintigrafía (por ejemplo, SPECT (Tomografía computarizada de emisión de un único fotón), PET (Tomografía de emisión de positrones), captura de imágenes con cámara gamma y exploración rectilínea), captura de imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, captura de imágenes por resonancia magnética convencional, captura de imágenes por transferencia de magnetización (MTI), espectroscopia de resonancia magnética de protones (MRS), captura de imágenes ponderada de difusión (DWI) y captura de imágenes por MR funcional (fMRI)), y ultrasonidos.

#### V.C. Aplicaciones terapéuticas

50 La presente invención se refiere además a procedimientos y composiciones útiles para inducir la citólisis de células cancerosas que expresan 5T4 en un sujeto. Los conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco de la invención son útiles para inhibir el crecimiento de células cancerosas y células de un trastorno proliferativo no neoplásico, tales como hiperplasia, metaplasia, o más particularmente displasia (para una revisión de dichas condiciones de crecimiento anómalas, véase DeVita, Jr. y col. (2001), Cancer: Principles and Practice, 6° edición, Lippincott Williams & Wilkins.

Los cánceres adecuados para dirección usando conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco incluyen tumores

5 primarios y metastásicos que expresan 5T4 en mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar, conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario incluyendo riñón, vejiga y urotelio, tracto genital femenino, cuello uterino, útero, ovarios, tracto genital masculino, próstata, vesículas seminales, testículos, una glándula endocrina, glándula tiroidea, glándula adrenal, glándula hipófisis, piel, hueso, tejidos blandos, vasos sanguíneos, cerebro, nervios, ojos, meninges. Otros cánceres relevantes son leucemias y linfomas que expresan 5T4 (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin), incluyendo leucemia o linfoma indolente, agresivo, de grado bajo, de grado intermedio, o de grado alto.

10 En particular, se sabe que 5T4 se expresa en células de carcinoma de pulmón adenomatoso/escamoso (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de mama invasivo, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma de cuello uterino escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma de páncreas invasivo, carcinoma ovárico, carcinoma vesical escamoso y coriocarcinoma. Se detecta 5T4 a niveles altos en carcinomas de bronquios, mama, colon, recto, estómago, cuello uterino, endometrio, páncreas, ovarios, corion y vesículas seminales. La distribución de la superficie celular del antígeno 5T4 puede ser homogénea o heterogénea. En carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico y carcinoma ovárico, la expresión de 5T4 está directamente relacionada con la progresión de la enfermedad. En el carcinoma de mama, se observa aumento de la intensidad de la tinción de 5T4 en nódulos metastásicos, sin embargo, la expresión de 5T4 no se correlaciona con el estadio de enfermedad. Los cánceres también pueden expresar el antígeno de carbohidrato de Lewis Y incluyendo carcinomas de mama, colon, gástrico, esofágico, pancreático, duodenal, de pulmón, de vejiga y renal y tumores neuroendocrinos gástricos y de células de islotes. Véase Patente de E.E.U.U. N°: 6.310.185.

20 Por lo tanto, los pacientes para tratar con los conjugados de anti 5T4/fármaco de la invención pueden seleccionarse basándose en la expresión de biomarcadores, incluyendo pero sin limitación expresión elevada de antígeno 5T4, que da como resultado una población de pacientes seleccionados para expresión de diana enriquecida en lugar de origen tumoral o histología. La expresión de diana puede medirse en función del número de células que se tiñen en combinación con la intensidad de la tinción celular. Por ejemplo, la clasificación de alta expresión de 5T4 incluye los pacientes con más del 30 % (es decir, 40 %, 50 % o 60 %) de las células ensayadas por tinción inmunohistoquímica positivas para 5T4 a un nivel de 3+ (en una escala de 1 a 4), mientras que la expresión moderada del 5T4 puede incluir los pacientes con más del 20 % de las células con tinción de 1+ a 2+.

30 Pueden usarse también biomarcadores distintos de la expresión del antígeno 5T4 para selección de pacientes, incluyendo caracterización del tumor basándose en la resistencia multifarmacológica (MDR), por ejemplo. Casi el 50 % de los cánceres humanos son completamente resistentes a quimioterapia o responden de forma solo transitoria, después de lo cual ya no se ven afectados por fármacos antineoplásicos usados habitualmente. Este fenómeno se denomina MDR y se expresa inherentemente por algunos tipos tumorales, mientras que otros adquieren MDR después de exposición a tratamiento de quimioterapia. La bomba de flujo de salida de fármaco P-glucoproteína media en una mayoría de las MDR asociadas con productos quimioterapéuticos citotóxicos. El análisis fenotípico y funcional de los mecanismos de MDR presentes en muestras de ensayo de tumores de pacientes con cáncer puede realizarse para relacionar un mecanismo o mecanismos de MDR específicos con la resistencia a quimioterapia en tipos tumorales específicos.

40 El crecimiento canceroso o proliferación anómala se refieren a uno cualquiera de varios índices que sugieren un cambio dentro de las células a una forma de cáncer más desarrollada o patología. La inhibición del crecimiento de células cancerosas o células de un trastorno proliferativo no neoplásico puede ensayarse por procedimientos conocidos en la técnica, tales como crecimiento de tumor retardado e inhibición de la metástasis. Otros índices para medir la inhibición del crecimiento de cáncer incluyen una reducción de la supervivencia de células cancerosas, una reducción del volumen o la morfología del tumor (por ejemplo, como se determina usando tomografía computarizada (CT), sonografía u otro procedimiento de captura de imágenes), destrucción de vasculatura tumoral, rendimiento mejorado en el ensayo cutáneo de hipersensibilidad retardada, un aumento de la actividad de linfocitos T citolíticos, y una reducción de los niveles de antígenos específicos de tumor.

50 Sin pretender quedar ligado a cualquier modo de actuación individual, tanto la dirección guiada por antígeno como la dirección pasiva de conjugados de anticuerpo anti 5T4/fármaco pueden contribuir a la eficacia antitumoral. La dirección guiada por antígeno se refiere al movimiento preferente y/o acumulación de un péptido o análogo peptídico en un tejido diana (es decir, un tejido que comprende células que expresan 5T4 y el sitio pretendido para acumulación de un conjugado de anti 5T4/fármaco) en comparación con un tejido de control (es decir, un tejido que se sospecha que carece sustancialmente de células que expresan 5T4 y unión y/o acumulación de un conjugado de anti 5T4/fármaco administrado). La localización preferente de un conjugado de anticuerpo/fármaco es generalmente tal que una cantidad de conjugado de anticuerpo/fármaco en un tejido diana es aproximadamente 2 veces mayor que una cantidad de conjugado de anticuerpo/fármaco en un tejido de control, tal como una cantidad que es aproximadamente 5 veces o más, o aproximadamente 10 veces o más.

60 La dirección pasiva se refiere en general a secuestrar anticuerpos o conjugados de fármaco/anticuerpo en un sitio tumoral debido a cambios locales en la vasculatura. Por ejemplo, los conjugados de anti 5T4/fármaco pueden dejar la vasculatura en el sitio del tumor, que está fenestrado debido al aumento de la producción de VEGF, unirse con células que expresan 5T4 y desencadenar la internalización del conjugado de anti 5T4/fármaco. El mal drenaje venoso y linfático del tumor también puede dar como resultado el secuestro de conjugados de anti 5T4/fármaco no

unidos. Los anticuerpos conjugados con fármacos con engarces lábiles por ácido pueden liberar el fármaco, que después se difunde en células tumorales. Los efectos antitumorales de la dirección pasiva no son permanentes o tan potentes como los inducidos por dirección guiada por antígeno, pero pueden contribuir a la eficacia total.

#### V.D. Formulaciones

5 Se preparan fácilmente anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/fármaco de la invención y se formulan para su uso clínico seguro y eficaz. Las formulaciones adecuadas para administración a un sujeto incluyen soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal), solutos que hacen a la formulación isotónica con los fluidos corporales del receptor pretendido (por ejemplo, azúcares, sales y polialcoholes), agentes de suspensión y agentes espesantes. Los disolventes adecuados incluyen agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas de los mismos. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y frascos, y pueden almacenarse en una condición congelada o criodesecada (liofilizada) que requiere solamente la adición de vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso para la administración a un sujeto o para posterior radiomarcaje con un isótopo apropiado para la aplicación pretendida. Los anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención se formulan preferentemente como una dosis eficaz, descrita posteriormente.

Como un ejemplo, una formulación de anticuerpo anti 5T4 o conjugado de anti 5T4/fármaco representativa comprende una formulación multidosis de anticuerpo o conjugado de anticuerpo/fármaco 40 mg/ml, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, alcohol bencílico 0,9 %, polisorbato 20 0, al 02 % a pH 5,0, y que tiene un periodo de validez mínimo de dos años en almacenamiento a 2-8 °C. Como otro ejemplo, una formulación de anticuerpo anti 5T4 o conjugado de anti 5T4/fármaco puede comprender anticuerpo 10 mg/ml o conjugado de anticuerpo/fármaco en cloruro sódico 9,0 mg/ml, citrato sódico dihidrato 7,35 mg/ml, polisorbato 80 al 0,7 mg/ml y agua estéril, pH 6,5. Las formulaciones representativas de un conjugado de anti 5T4/caliqueamicina para administración a modelos de ratón experimentales incluyen 2 µg o 4 µg de caliqueamicina (véase Ejemplos 3, 4 y 7), que pueden cambiarse de escala de forma correspondiente para su administración a seres humanos.

Una formulación liofilizada estable de un anticuerpo anti 5T4 o conjugado de anticuerpo/fármaco pueden prepararse (a) disolver un conjugado de anticuerpo/fármaco hasta una concentración final de 0,5 a 2 mg/ml en una solución que comprende un crioprotector a una concentración de 1,5 %-5 % en peso, un agente de masificación polimérico a una concentración de 0,5-1,5 % en peso, electrolitos a una concentración de 0,01 M a 0,1 M, un agente facilitador de la solubilidad a una concentración de 0,005 % a 0,05 % en peso, agente tamponante a una concentración de 5-50 mM de modo que el pH final de la solución sea 7,8-8,2, y agua; (b) dispensar la solución anterior en frascos a una temperatura de +5 °C a +10 °C; (c) congelar la solución a una temperatura de congelación de -35 °C a -50 °C; (d) someter la solución congelada a una etapa de liofilización inicial a una presión de secado primaria de 20 a 80 micrómetros a una temperatura de almacenamiento de -10 °C a -40 °C durante 24 a 78 horas; y (e) someter el producto liofilizado de la etapa (d) a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 20 a 80 micrómetros a una temperatura de almacenamiento de +10 °C a +35 °C durante 15 a 30 horas.

Los crioprotectores representativos útiles para liofilización del crioprotector incluyen alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietilenglicol, ácido aldónico, ácido urónico, ácido aldárico, aldosas, cetosas, azúcares de amino, alditoles, inositoles, gliceraldehídos, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, metil  $\alpha$ -glucopiranosido, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrusosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, sacarosa, trehalosa, ácido neuramínico, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, levano, fucoidano, carragenina, galactocarolosa, pectinas, ácidos pécticos, amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma de xantano, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, etilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol y pentaeritritol.

Por ejemplo, el crioprotector sacarosa puede usarse a una concentración de 1,5 % en peso, el agente de masificación polimérico Dextrano 40 o hidroxietil almidón 40 puede usarse a una concentración de 0,9 % en peso, el electrolito usado en la solución de liofilización es cloruro sódico, que está presente a una concentración de 0,05 M, y el agente tamponante trometamina puede usarse a una concentración de 0,02 M. Puede usarse también un agente facilitador de la solubilidad (por ejemplo, un tensioactivo tal como Polisorbato 80) durante el procedimiento de liofilización. Habitualmente este agente facilitador de la solubilidad es un tensioactivo. Las etapas representativas para la preparación de una formulación liofilizada incluyen congelar los frascos a una temperatura de -45 °C, la solución congelada se somete a una etapa de liofilización inicial a una presión de secado primaria de 60 micrómetros y a una temperatura de almacenamiento de -30 °C durante 60 horas; y someter el producto liofilizado a una etapa de secado secundaria a una presión de secado de 60 micrómetros a una temperatura de almacenamiento de +25 °C durante 24 horas.

60 Se formulan anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco en un vehículo farmacéuticamente aceptable,

por ejemplo, macromoléculas metabolizadas lentamente grandes tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas. También pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos. Las formulaciones pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol y/o pueden estar presentes en dichas composiciones sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Dichos vehículos permiten que las composiciones se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas y suspensiones, para ingesta por el paciente.

#### 10 V.E. Dosis y administración

Los anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/fármaco de la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, mediante administración intravascular, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Para la administración de composiciones a rutas pulmonares, las composiciones pueden administrarse como un aerosol o pulverización gruesa, es decir administración transnasal. Puede usarse la administración intratecal, intramedular o intraventricular para el tratamiento de cánceres del sistema nervioso central (SNC) y cánceres relacionados con el SNC. También pueden administrarse anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/fármaco por vía transdérmica, vía transcutánea, vía tópica, vía entérica, vía intravaginal, vía sublingual o vía rectal. Puede usarse rutinariamente administración intravenosa en la clínica. Un procedimiento de suministro se selecciona basándose en consideraciones tales como la afección y el sitio para tratar, el tipo de formulación de anticuerpo y la eficacia terapéutica de la composición.

La presente invención permite que se administre una cantidad eficaz de un anticuerpo anti 5T4 y conjugado de anti 5T4/fármaco a un sujeto, es decir, una cantidad de un anticuerpo anti 5T4 o conjugado de anti 5T4/fármaco suficiente para inducir una respuesta biológica deseada. Por ejemplo, cuando se administra a un sujeto que porta cáncer, una cantidad eficaz comprende una cantidad suficiente para inducir actividad antineoplásica, incluyendo citólisis de células cancerosas, inhibición de la proliferación de células cancerosas, inducción de la apoptosis de células cancerosas, reducción de los antígenos de células cancerosas, retardo del crecimiento tumoral y/o inhibición de la metástasis. La reducción del tumor está bien aceptada como un marcador sustituto clínico de eficacia. Otro marcador bien aceptado para la eficacia es la supervivencia sin progresión. Los conjugados de anti 5T4/caliqueamicina demuestran generalmente al menos una mejora del 25 % en parámetros de eficacia claves, tales como mejora de la mediana de la supervivencia, tiempo hasta la progresión tumoral y velocidad de respuesta general.

En general, una dosis eficaz estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup>, tal como de aproximadamente 0,1 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>, o aproximadamente 15 mg/m<sup>2</sup>, dosis que se calcula basándose en la cantidad de anticuerpo anti 5T4. También puede calcularse una dosis eficaz de un conjugado de anti 5T4/fármaco basándose en una cantidad del fármaco conjugado. Por ejemplo, las dosis representativas de un conjugado de anti 5T4/caliqueamicina para administración a modelos de ratón experimentales incluyen 2 µg o 4 µg de caliqueamicina, que pueden cambiarse de escala de forma correspondiente para administración a seres humanos. Por ejemplo, pueden administrarse conjugados de anti 5T4/caliqueamicina de la invención a pacientes humanos una vez cada 3 semanas durante hasta 6 ciclos. Para un anticuerpo anti 5T4 radiomarcado, una dosis eficaz está típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 mCi a aproximadamente 300 mCi, normalmente de aproximadamente 5 mCi a 100 mCi, dependiendo del radioisótopo y la afinidad de unión del anticuerpo.

Para la detección de células positivas para 5T4 usando los anticuerpos anti 5T4 desvelados, se administra una cantidad detectable de una composición de la invención a un sujeto, es decir, una dosis de un anticuerpo anti 5T4 de modo que la presencia del anticuerpo pueda determinarse *in vitro* o *in vivo*. Para captura de imágenes escintigráficas usando radioisótopos, las dosis típicas de un radioisótopo pueden incluir una actividad de aproximadamente 10 µCi a 50 mCi, de aproximadamente 100 µCi a 25 mCi, de aproximadamente 500 µCi a 20 mCi, de aproximadamente 1 mCi a aproximadamente 10 mCi, o aproximadamente 10 mCi.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en una composición de la invención pueden variarse para administrar una cantidad de la composición que sea eficaz para conseguir el resultado de diagnóstico o terapéutico deseado. Los regímenes de administración también pueden variarse. Puede usarse una única inyección o múltiples inyecciones. El nivel de dosificación y régimen seleccionado dependerán de una diversidad de factores incluyendo la actividad y estabilidad (es decir, semivida) de la composición terapéutica, formulación, la vía de administración, combinación con otros fármacos o tratamientos, la enfermedad o trastorno para detectar y/o tratar, y la condición física e historial médico previo del sujeto que se trate.

Para anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/fármaco de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, tales como roedores, conejos, perros, cerdos y/o primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentraciones y la vía de administración apropiados. Dicha información puede usarse después para determinar las dosis útiles y vías de administración en seres humanos. Típicamente, se administra una dosis mínima, y la dosis se aumenta de escala en

ausencia de citotoxicidad limitante de dosis. La determinación y ajuste de una cantidad o dosis eficaz, así como la evaluación de cuándo y cómo realizar dichos ajustes, se conocen por los expertos en la técnica médica.

5 Para terapias de combinación, se administran anticuerpos anti 5T4, conjugados de anti 5T4/fármaco y/o agentes terapéuticos o de diagnóstico adicionales en cualquier periodo de tiempo adecuado para la realización de la terapia o el diagnóstico pretendido. Por lo tanto, los agentes individuales pueden administrarse de forma sustancialmente simultánea (es decir, como una única formulación o en un intervalo de minutos u horas) o de forma consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, pueden administrarse tratamientos de agente individual en un intervalo de aproximadamente 1 año entre sí, tal como en un intervalo de aproximadamente 10, 8, 6, 4 o 2 meses, o en un intervalo de 4, 3, 2 o 1 semanas o en un intervalo de aproximadamente 5, 4, 3, 2 o 1 días.

10 Para directrices adicionales con respecto a la formulación, dosis, régimen de administración y resultados terapéuticos medibles, véase Berkow y col. (2000) *The Merck Manual of Medical Information*, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey; Ebadi (1998) *CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology*, CRC Press, Boca Raton, Florida; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania; Katzung (2001) *Basic & Clinical Pharmacology*, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Div., Nueva York; Hardman y col. (2001) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, The McGraw-Hill Companies, Columbus, Ohio; Speight & Holford (1997) *Avery's Drug Treatment: A Guide to the Properties, Choices, Therapeutic Use and Economic Value of Drugs in Disease Management*, Lippincott, Williams, & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania.

#### V.F. Terapias de combinación

20 Los anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/fármaco desvelados pueden administrarse como un tratamiento inicial, o para el tratamiento de afecciones que no son sensibles a las terapias convencionales. Además, los anticuerpos anti 5T4 y conjugados anti 5T4/fármaco pueden usarse en combinación con otras terapias (por ejemplo, escisión quirúrgica, radiación, fármacos antineoplásicos adicionales, etc.) para inducir de este modo efectos terapéuticos aditivos o potenciados y/o reducir la hepatocitotoxicidad de algunos agentes antineoplásicos. Los anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/fármaco de la invención pueden coadministrarse o coformularse con agentes adicionales, o formularse para su administración consecutiva con agentes adicionales en cualquier orden.

Los agentes representativos útiles para terapia de combinación incluyen cualquiera de los fármacos descritos anteriormente en el presente documento como útiles para la preparación de conjugados de anti 5T4/fármaco. Los anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/fármaco de la invención también pueden usarse en combinación con otros anticuerpos terapéuticos y conjugados de anticuerpo/fármaco, incluyendo anticuerpos anti 5T4 distintos de los anticuerpos anti 5T4 desvelados, así como anticuerpos y conjugados que se dirigen a un antígeno diferente. Los anticuerpos representativos que pueden usarse solos o como un conjugado de anticuerpo/fármaco, incluyen anticuerpos anti CD19, anticuerpos anti CD20 (por ejemplo, RITUXAN®, ZEVALIN®, BEXXAR®), anticuerpos anti CD22, anticuerpos anti CD33 (por ejemplo MYLOTARG®), conjugados de anticuerpo anti CD33/fármaco, anticuerpos anti Lewis Y (por ejemplo, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anticuerpos anti HER-2 (por ejemplo, HERCEPTIN® (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG® (pertuzumab, rhu-MAb 2C4)), anticuerpos anti CD52 (por ejemplo, CAMPATH®), anticuerpos anti EGFR (por ejemplo, ERBITUX® (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anticuerpos anti VEGF (por ejemplo, AVASTIN® (bevacizumab)), anticuerpos anti complejo de ADN/histona (por ejemplo, ch-TNT-1/b), anticuerpos anti CEA (por ejemplo, CEA-Cide, YMB-1003) hLM609, anticuerpos anti CD47 (por ejemplo, 6H9), anticuerpos anti VEGFR2 (o receptor que contiene dominio de inserto de quinasa, KDR) (por ejemplo, IMC-1C11), anticuerpos anti Ep-CAM (por ejemplo, ING-1), anticuerpos anti FAP (por ejemplo, sibrotuzumab), anticuerpos anti DR4 (por ejemplo, TRAIL-R), anticuerpos anti receptor de progesterona (por ejemplo, 2C5), anticuerpos anti CA19.9 (por ejemplo, GIVAREX®) y anticuerpos anti fibrina (por ejemplo, MH-1).

45 También pueden administrarse conjugados de anticuerpo anti 5T4/fármaco junto con una o más combinaciones de gentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento. Las preparaciones citotóxicas útiles para este fin incluyen CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y procarbacin); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbacin, bleomicina, vincristina y prednisona); m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorina); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbacin); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina); MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbacin); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacin); MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbacin) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina); MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbacin) alternando con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacin); CHIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbacin, prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, etopósido); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, etopósido); DHAP (dexametasona, citarabina de dosis alta y cisplatino); ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina HD y cisplatino); CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbacin, prednisona y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona); y CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona); DHAP (cisplatino, citarabina de dosis alta y dexametasona); CAP (ciclofosfamida, doxorubicina,

5 cisplatino); PV (cisplatino, vinblastina o vindesina); CE (carboplatino, etopósido); EP (etopósido, cisplatino); MVP (mitomicina, vinblastina o vindesina, cisplatino); PFL (cisplatino, 5-fluorouracilo, leucovorina); IM (ifosfamida, mitomicina); IE (ifosfamida, etopósido); IP (ifosfamida, cisplatino); MIP (mitomicina, ifosfamida, cisplatino); ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido); PIE (cisplatino, ifosfamida, etopósido); Vinorelbina y cisplatino; Carboplatino y paclitaxel; CAV (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina); CAE (ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido); CAVE (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, etopósido); EP (etopósido, cisplatino); y CMCcV (ciclofosfamida, metotrexato, lomustina, vincristina).

10 Pueden usarse anticuerpos anti 5T4 y conjugados de anti 5T4/caliqueamicina en combinación con fármacos antineoplásicos sistémicos, tales como epítionas (BMS-247550, Epo-906), reformulaciones de taxanos (Abraxano, Xyotax), inhibidores de microtubulina (MST-997, TTI-237) o con citotoxinas dirigidas tales como CMD-193 y SGN-15. Los agentes antineoplásicos útiles adicionales incluyen TAXOTERE®, TARCEVA®, GEMZAR® (gemcitabina), 5-FU, AVASTIN®, ERBITUX®, TROVAX®, anatumomab mafenatox, letrozol, docetaxel y antraciclina.

15 Para terapias de combinación, se administran un anticuerpo anti 5T4, conjugado de anti 5T4/fármaco y/o uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico adicionales dentro de cualquier periodo de tiempo adecuado para la realización de la terapia o el diagnóstico pretendidos. Por lo tanto, los agentes individuales pueden administrarse de forma sustancialmente simultánea (es decir, como una única formulación o en un intervalo de minutos u horas) o de forma consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, pueden administrarse tratamientos de un único agente en un intervalo de aproximadamente 1 año entre sí, tal como en un intervalo de aproximadamente 10, 8, 6, 4 o 2 meses, o en un intervalo de 4, 3, 2 o 1 semanas, o en un intervalo de aproximadamente 5, 4, 3, 2 o 1 días. La administración de un anticuerpo anti 5T4 o conjugado de anti 5T4/caliqueamicina en combinación con un segundo agente terapéutico induce preferentemente un mayor efecto que la administración de uno de ellos solo.

### Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar modos de la invención. Ciertos aspectos de los siguientes ejemplos se describen con respecto a técnicas y procedimientos que los presentes coinventores han descubierto o contemplado que actúan bien en la práctica de la invención. Estos ejemplos ilustran prácticas de laboratorio convencionales de los coinventores. A la luz de la presente divulgación y el nivel general de experiencia en la técnica, los expertos en la materia apreciarán que se pretende que los siguientes ejemplos sean solamente ejemplares.

#### Ejemplo 1

30 Anticuerpos murinos anti 5T4

Se prepararon anticuerpos anti 5T4 en ratones usando antígeno 5T4 humano y procedimientos convencionales para inmunización. Se produjeron líneas celulares de hibridoma que producían los anticuerpos A1, A2 y A3 por fusión de linfocitos B individuales con células de mieloma.

35 Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos anti 5T4 A1, A2 y A3 se clonaron usando el sistema de síntesis de ADNc SMART® (Clontech Laboratories Inc. of Mountain View, California) seguido de amplificación por PCR. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total aislado de células de hibridoma A1, A2 o A3, usando oligo(dT) y el oligo SMART® IIA (Clontech Laboratories Inc.) con transcriptasa inversa POWERSCRIPT™ (Clontech Laboratories Inc.). El ADNc se amplificó después por PCR usando un cebador que hibrida con la secuencia de oligo SMART® IIA y el cebador específico de región constante de ratón (Kappa de ratón para la cadena ligera, IgG2a de ratón para la cadena pesada de A1, IgG2b de ratón para la cadena pesada de A2 e IgG1 de ratón para la cadena pesada de A3) con polimerasa VENT® (New England Biolabs Inc. de Ipswich, Massachusetts). Se subclonaron productos de PCR de región variable de cadena pesada y cadena ligera en el vector de expresión pED6 y se determinó la secuencia de ácido nucleico. Este procedimiento es ventajoso porque no se requiere ningún conocimiento previo de la secuencia de ADN. Además, la secuencia de ADN resultante no se altera por el uso de cebadores de PCR degradados.

45 Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada de A1, A2 y A3 se exponen como los nucleótidos 58-414 de SEC ID N°: 1, nucleótidos 55-405 de SEC ID N°: 5 y nucleótidos 58-423 de SEC ID N°: 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de A1, A2 y A3 se exponen como los restos 20-138 de SEC ID N°: 2, los restos 19-135 de SEC ID N°: 6 y los restos 20-141 de SEC ID N°: 10, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena ligera de A1, A2 y A3 se exponen como los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 3, los nucleótidos 67-390 de SEC ID N°: 7 y los nucleótidos 61-381 de SEC ID N°: 11, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de A1, A2 y A3 se exponen como los restos 21-127 de SEC ID N°: 4, restos 23-130 de SEC ID N°: 8, y restos 21-127 de SEC ID N°: 12, respectivamente. Véase también las Figuras 1A-1C.

55 Para evaluar la novedad de las secuencias de región variable de anti 5T4 A1, A2 y A3, se realizaron búsquedas de BLASTp (para secuencias de consulta de proteínas) usando parámetros por defecto de Expectativa=10, Tamaño de Palabra=3, un filtro de complejidad baja y la matriz BLOSUM62, permitiendo costes de existencia de hueco=11 y extensión=1. Se realizaron búsquedas de BLASTn (para secuencias de consulta de nucleótidos) usando parámetros

por defecto de Expectativa=10, Tamaño de Palabra=11 y un filtro de complejidad baja. Los resultados de búsqueda de BLAST se presentan como una lista de secuencias relacionadas con la secuencia de consulta, clasificadas en orden de valor E, que es un indicador de la significación estadística de coincidencias identificadas en la base de datos. Las secuencias más estrechamente relacionadas con las secuencias de región variable usadas para el análisis de BLAST se identifican en la Tabla 1 (BLASTn) y Tabla 2 (BLASTp).

5

Tabla 1

Análisis de BLASTn		
Secuencia de consulta	Identidad (%) de la Secuencia Objeto más Cercana	Descripción de la Secuencia Objeto más Cercana
VH A1 (SEC ID N°: 1)	97 %	gi 31322165 gb AY169686.1  Precursor de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de <i>Mus musculus</i> clon VGBC1.13, gen, cds parcial
VL A1 (SEC ID N°: 3)	96 %	gi 804922 dbj D50385.1 MUSIKCVRJ ARNm de <i>Mus musculus</i> para la región variable de cadena kappa de inmunoglobulina, secuencia parcial, línea celular:K3F10
VH A2 (SEC ID N°: 5)	97 %	gi 11612012 gb AF303853.1 AF303853 ARNm de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de <i>Mus musculus</i> clon J558.22, cds parcial
VL A2 (SEC ID N°: 7)	97 %	gi 1556423 emb X79906.1 MMMABMST2 ARNm de <i>M. musculus</i> para la cadena ligera del anticuerpo monoclonal MST2
VH A3 (SEC ID N°: 9)	99 %	gi 3420272 gb AF064445.1 AF064445 Gen de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de <i>Mus musculus</i> (Vh10.2), alelo Vh10.2a, cds parcial
VL A3 (SEC ID N°: 11)	98 %	gi 2906107 gb AF045512.1 AF045512 Región variable de cadena ligera kappa de anticuerpo monoclonal 9E10 de <i>Mus musculus</i> , ARNm (IgK), cds parcial

Tabla 2

Análisis de BLASTp		
Secuencia de consulta	Identidad (%) de la Secuencia Objeto más Cercana	Descripción de la Secuencia Objeto más Cercana
VH A1 (SEC ID N°: 2)	84 %	gi 15865327 emb CAC82228.1  cadena pesada de inmunoglobulina [ <i>Mus musculus</i> ]
VL A1 (SEC ID N°: 4)	93 %	gi 644862 gb AAA62143.1  región V de cadena kappa de inmunoglobulina anti integrina alfa 4
VH A2 (SEC ID N°: 6)	85 %	gi 15149453 gb AAK85298.1  anticuerpo monocatenario HFN7.1 [construcción sintética]

(continuación)

Análisis de BLASTp		
Secuencia de consulta	Identidad (%) de la Secuencia Objeto más Cercana	Descripción de la Secuencia Objeto más Cercana
VL A2 (SEC ID N°: 8)	95 %	gij297678 emb CAA80086.1  región variable de inmunoglobulina [ <i>Mus musculus domesticus</i> ]
VH A3 (SEC ID N°: 10)	90 %	gij2906050 gb AAC04511.1  cadena pesada de anticuerpo monoclonal anti poli(dC) [ <i>Mus musculus</i> ]
VL A3 (SEC ID N°: 12)	97 %	gij2906108 gb AAC04540.1  cadena ligera kappa de anticuerpo monoclonal [ <i>Mus musculus</i> ]

**Ejemplo 2**

Especificidad de unión y afinidad de los anticuerpos anti 5T4 murinos

- 5 Para evaluar la especificidad de unión y afinidad de los anticuerpos A1, A2 y A3, se realizó análisis de BIACORE® usando el antígeno 5T4 humano inmovilizado en una microplaca CM5. La tecnología BIACORE® utiliza cambios en el índice refractario en la capa de superficie tras la unión del anticuerpo con el antígeno 5T4 inmovilizado en la capa. La unión se detecta por resonancia de plasmón superficial (SPR) de luz de láser que refracta de la superficie. El análisis de la velocidad de asociación y velocidad de disociación de la cinética de la señal permite la diferenciación entre interacciones no específicas y específicas. El anticuerpo anti 5T4 H8 se usó como un control. H8 es un anticuerpo IgG1 de ratón monoclonal generado por hibridoma descrito en la Publicación Internacional de PCT N° WO 98/55607 y en Forsberg y col. (1997) J. Biol. Chem. 272(19): 124430-12436.

Tabla 3

Resultados del Ensayo BIACORE®				
Anticuerpo	KD (M)	KA (1/M)	kd (1/s)	ka (1/Ms)
H8	$4,1 \times 10^{-10}$	$2,5 \times 10^9$	$5,1 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^5$
A1	$6,4 \times 10^{-10}$	$1,6 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^5$
A2	$1,5 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^7$	$8,7 \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^4$
A3	$2,2 \times 10^{-9}$	$4,6 \times 10^8$	$5,2 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^4$

- 15 Los resultados de BIACORE® muestran que los anticuerpos H8 y A1 tienen mayor afinidad por 5T4 en comparación con los anticuerpos A2 y A3. A2 es un anticuerpo de afinidad relativamente baja. Están presentes cisteínas poco habituales en el resto 67 de la región variable de cadena pesada de A1 y el resto 91 de la región variable de cadena pesada de A3. El reemplazo de estos restos con fenilalanina (A1) o tirosina (A3) no alteró las propiedades de unión al anticuerpo o los niveles de expresión.
- 20 La afinidad de unión de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 también se ensayó por transferencia de Western usando lisados celulares CT26/5T4, que identificaron unión fuerte con H8, A1 y A3. Véase Figura 2.
- 25 La capacidad de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 para unirse con células que expresan el antígeno 5T4 se ensayó usando separación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células PC14PE6. Todos los anticuerpos mostraron unión específica con células PC14PE6 que expresaban 5T4, sin embargo, el nivel de la unión con A2 fue significativamente inferior al observado para H8, A1 y A3. Véase Tabla 4.

Tabla 4

Resultados del Análisis de FACS	
Anticuerpo	Fluorescencia Celular Media
Control (Ab secundario)	4
Control (IgG murino)	4
H8	24
A1	18
A2	7
A3	27

5 Para evaluar la variabilidad potencial en la producción de anticuerpo, se ensayaron dos preparaciones independientes de A1 y H8. Las propiedades de unión y cinéticas de cada anticuerpo, cuando se compararon a partir de cada preparación, no fueron significativamente diferentes. Véase Figuras 3A-3B.

**Ejemplo 3**

Internalización de anticuerpos anti 5T4 murinos por células que expresan 5T4

10 Para evaluar la internalización de los anticuerpos tras su unión con el antígeno 5T4, se determinó la cantidad de anticuerpos H8 y A1 detectados en la superficie celular frente a en el sobrenadante en función del tiempo. Se expusieron células MDAMB435/5T4 no disociadas enzimáticamente (células de cáncer de mama humano) a anticuerpos anti 5T4 durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron e incubaron en medio a 37 °C durante 4 horas o 24 horas. La cantidad de anticuerpo unido a las membranas celulares frente a anticuerpo no unido (es decir, presencia en el sobrenadante) se determinó usando FACS. La desaparición de anticuerpos de 5T4 de la superficie de células MDAMB435/5T4 demuestra la modulación del complejo de antígeno 5T4/anticuerpo en la superficie celular, lo que puede indicar internalización y/o disociación. Véase Figuras 4A-4C.

**Ejemplo 4**

Mapeo de epítomos usando quimeras de 5T4

20 Para identificar los epítomos con los que se unen cada uno de los anticuerpos A1, A2, A3 y H8, se realizaron ensayos ELISA usando (1) construcciones de Fc de ectodominio de 5T4 con secuencias suprimidas o mutadas y (2) construcciones quiméricas de 5T4 expresadas de forma transitoria en células COS-1. El ectodominio incluye la región amino terminal, dos repeticiones ricas en leucina y la región hidrófila intermedia. Se prepararon proteínas de fusión que contenían un ectodominio 5T4 y una región constante de Fc de IgG1 humano usando 5T4 de ratón (aminoácidos 1-361), 5T4 de rata (aminoácidos 1-361), 5T4 de mono cynomolgus (aminoácidos 1-355), 5T4 de chimpancé (aminoácidos 1-355) y tití de cola negra (aminoácidos 1-355). Las construcciones quiméricas de 5T4 se representan en la Figura 5. Los resultados de unión se resumen en la Tabla 5, que indica unión específica, unión parcial o falta de unión, por cada uno de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3. Los anticuerpos H8 humanizado y A1, A2 y A3 quiméricos mostraron propiedades de unión similares al H8, A1, A2 y A3 murinos respectivamente.

30 Basándose en estos resultados, se determinó que el anticuerpo H8 humanizado se une con 5T4 humano entre los restos 173 y 252. H8 humanizado se une con 5T4 con o sin glucosilación ligada a N en el resto 344, lo que confirma que la unión del H8 humanizado con 5T4 humano no es próxima a la membrana. El anticuerpo A1 tiene un primer contacto con 5T4 humano entre los restos 173 y 252 y un segundo contacto con 5T4 humano entre los restos 282 y 361. El anticuerpo A2 se une con 5T4 humano entre los restos 282 y 361. El anticuerpo A3 se une con la primera región de repeticiones ricas en leucina de 5T4 humano entre los restos 83 a 163. Los epítomos unidos con cada anticuerpo se representan en la Figura 7.

35

Tabla 5

Resultados del Mapeo de Epítomos Usando Fusiones de Fc del Ectodominio de 5T4 y Quimeras de 5T4 de Ratón/Humano				
construcción de antígeno 5T4	Anticuerpo			
	H8	A1	A2	A3
Fc de ectodominio de 5T4 humano	+	+	+	+
Fc de ectodominio de 5T4 de ratón	-	-	-	-
Fc de ectodominio de 5T4 de rata	-	+/-	-	-
Fc de ectodominio de 5T4 de mono cynomolgus	-	+	+	+
Fc de ectodominio de 5T4 de chimpancé	+	+	+	+
Fc de ectodominio de 5T4 de títí de cola negra	+/-	+	+	-
83-163 de ser humano/ratón	+	+	+	-
173-361 de ser humano/ratón	-	-	-	+
173-258 de ser humano/ratón	-	+/-	+	+
282-361 de ser humano/ratón (con o sin enlace a N en la posición 344)	+	+/-	-	+
(+) unión; (-) sin unión; (+/-) unión parcial				

5 Basándose en la unión diferente observada con ectodominios de 5T4 de ser humano y mono cynomolgus, se realizaron mutaciones dirigidas para distinguir restos que participan en la unión a anticuerpo. La unión del anticuerpo H8 humanizado se ensayó con cada uno de los ectodominios de 5T4 mutados observados en la Tabla 6 a continuación, es decir, ectodominios de 5T4 humanos que incluyen un resto de mono cynomolgus en la posición indicada. Estos resultados mostraron que los restos 213 y 214 del antígeno 5T4 humano son necesarios para el epítipo con el que se une el H8 humanizado.

Tabla 6

Resultados del Mapeo de Epítomos Usando Fusión de Fc/Ectodominio de 5T4 Humano con Mutaciones Dirigidas	
mutación	unión de H8 humanizado
E189K	+
V200K	+
L204V	+
R213H	+/-
R213H y R214L	-
(±) unión; (-) sin unión; (+/-) unión parcial	

10

Además de los ensayos de unión directa, se realizaron ensayos de unión competitiva usando anticuerpo H8 humanizado biotinilado y cada uno de los anticuerpos A1, A2 o A3. No se observó inhibición de la unión con 5T4 humano, lo que apoya que cada uno de A1, A2 y A3 se une con un epítipo de 5T4 que es distinto de con el que se une el anticuerpo H8. Véase Figuras 6A-6.

15

**Ejemplo 5**

Mapeo de epítomos usando BIACORE®

5 También se realizó mapeo de epítomos de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 usando BIACORE® usando una microplaca CM5 con antígeno 5T4 humano unido. La microplaca se saturó con anticuerpo H8, A1, A2 o A3 y se midió una primera respuesta. Después se saturó la microplaca con un segundo anticuerpo de entre los anticuerpos H8, A1, A2 y A3, y se midió una segunda respuesta. Para múltiples experimentos, la microplaca se regeneró por disociación de los anticuerpos unidos en glicina 10 mM, pH 1,5, seguido de un lavado en tampón. Los resultados se resumen en la Tabla 7 a continuación. Los porcentajes mostrados son las unidades de respuesta medidas tras la unión con un segundo anticuerpo directamente con la microplaca CM5 divididas por las unidades de respuesta medidas tras la unión del segundo anticuerpo con una microplaca CM5 saturada con un primer anticuerpo. Estos resultados muestran que H8, A1, A2 y A3 se unen cada uno con un epítipo distinto en 5T4 humano. Los epítomos unidos con los anticuerpos H8 y A3 están estéricamente cerca entre sí de modo que la velocidad de asociación con el antígeno se reduce cuando se ensaya la unión de H8 en presencia de A3, y viceversa. Se obtuvieron resultados similares usando los anticuerpos quiméricos y humanizados H8, A1, A2 y A3, que se prepararon como se describe en el Ejemplo 7 posteriormente en el presente documento. Véase Tabla 8.

Tabla 7

Resultados de Ensayos de Competición Usando BIACORE® - Porcentaje de Respuesta del Segundo Anticuerpo Después de Saturación con el Primer Anticuerpo				
2º anticuerpo	1º anticuerpo			
	H8	A1	A2	A3
H8	---	114 %	102 %	85 %
A1	109 %	---	109 %	98 %
A2	99 %	98 %	---	94 %
A3	73 %	104 %	106 %	---

Tabla 8

Resultados de Ensayos de Competición Usando BIACORE® - Porcentaje de Segundo Anticuerpo Unido Después de Saturación con el Primer Anticuerpo						
segundo anticuerpo/primer anticuerpo unido	tiempo después de la inyección del segundo anticuerpo (segundos)					
	19	37,5	75	150	300	600
H8 humanizado/A3 quimérico	44,9 %	57,0 %	69,1 %	79,4 %	86,6 %	91,3 %
A3 quimérico/H8 humanizado	46,2 %	51,2 %	58,4 %	67,5 %	76,2 %	83,6 %
A2 quimérico/A1 quimérico	102,9 %	93,5 %	90,1 %	89,0 %	88,9 %	89,1 %
A1 quimérico/A2 quimérico	92,5 %	90,6 %	91,4 %	92,7 %	93,9 %	95,5 %
A3 quimérico/A1 quimérico	82,1 %	82,0 %	84,5 %	87,8 %	90,8 %	92,8 %
A1 quimérico/A3 quimérico	98,8 %	96,5 %	97,0 %	98,0 %	98,8 %	99,6 %
A3 quimérico/A2 quimérico	92,2 %	88,6 %	89,5 %	91,5 %	93,4 %	94,6 %
A2 quimérico/A3 quimérico	89,2 %	88,4 %	89,8 %	91,5 %	92,9 %	94,3 %
H8 humanizado/A1 quimérico	93,2 %	92,7 %	94,2 %	95,9 %	96,9 %	97,3 %
A1 quimérico/H8 humanizado	92,7 %	92,4 %	93,8 %	95,8 %	97,3 %	98,7 %
H8 humanizado/A2 quimérico	93,8 %	94,0 %	96,0 %	98,1 %	99,8 %	101,3 %
A2 quimérico/H8 humanizado	86,9 %	84,7 %	86,9 %	90,5 %	93,7 %	96,7 %

Los resultados combinados de los estudios de mapeo de epítomos como se determina usando construcciones químicas (véase Ejemplo 4) y BIACORE® se presentan en la Figura 7.

**Ejemplo 6**

Eficacia de los conjugados de anti 5T4/caliqueamicina

- 5 Se usó una tinción de colorante vital (MTS) para determinar el número de células supervivientes después de la exposición a diversos tratamientos. Se obtuvo MTS (kit de ensayo de proliferación celular no radiactivo) de Promega (Madison, Wisconsin) y se usó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para cada línea celular se estableció una curva de calibración (número de células frente a densidad óptica después de 2 horas) para estimar una densidad de siembra inicial apropiada. Las células se sembraron después en placas de 96 multipocillos a una
- 10 densidad de 750 a 5.000 células por pocillo. Inmediatamente después de sembrar, las células se expusieron a diversas concentraciones (0, 0,01, 0,05, 0,1, 1, 10, 100 y 500 ng de equivalentes de caliqueamicina/ml) de caliqueamicina, CMA-676 y conjugados de caliqueamicina de anticuerpos anti 5T4. Después de la determinación del número de células supervivientes 96 horas después de la exposición al fármaco, se calculó la DE<sub>50</sub> basándose en los parámetros de regresión logísticos derivados de las curvas de respuesta a dosis. La DE<sub>50</sub> se definió como la
- 15 concentración de fármaco (CalichDMH) que provocó una reducción del 50 % del número de células después de 96 horas de exposición al fármaco. Un equivalente de caliqueamicina (cal. eq.) es la concentración de caliqueamicina proporcionada como una sustancia pura o como un conjugado. Dependiendo de la cantidad de caliqueamicina unida con el anticuerpo (carga farmacológica del anticuerpo), los equivalentes de caliqueamicina que son diferentes pueden indicar diferentes concentraciones de proteínas.
- 20 Los resultados de los ensayos de MTS se muestran en la Tabla 9. Los conjugados de anticuerpo/caliqueamicina preparados usando los ensayos de anti 5T4 A1 y A3 redujeron sustancialmente la viabilidad de células MDAMB435/5T4. Se calcularon los valores de selectividad comparando la actividad específica del conjugado con la actividad no específica. Es decir, el factor de CalichDMH con respecto a las células que expresaban 5T4 se dividió por el factor de los valores de CalichDMN para células que no expresaban 5T4. Cuando se usa un anticuerpo no
- 25 específico, por ejemplo hp67.6 (CMA-676), el factor de los valores de CalichDMH son aproximadamente iguales de modo que la selectividad sea 1.

Tabla 9

Resultados de Ensayos de MTS		
Tratamiento	línea celular	
	DE50 de MDAMB435/neo (ng/ml)	DE50 de MDAMB435/5T4 (ng/ml)
CalichDMH	3,3 - 5,0	5,0 - 8,0
huHB-ActBut-CalichDMH	0,4 - 0,8	0,08 - 0,1
CMA-676	34 - 60	50 - 100
A1-ActBut-CalichDMH	22 - 34	0,4 - 0,6
A2-ActBut-CalichDMH	60	40
A3-ActBut-CalichDMH	20 - 20	0,3 - 20
tratamiento	línea celular	
	Factor de CalichDMH de MDAMB435/neo	Factor de CalichDMH de MDAMB435/5T4
CalichDMH	1,0 - 1,0	1,0 - 1,0
huHB-ActBut-CalichDMH	4,0 - 12,5	50 - 100
CMA-676	0,08 - 0,1	0,08 - 0,1
A1-ActBut-CalichDMH	0,14 - 0,15	13 - 13
A2-ActBut-CalichDMH	0,06	0,13

(continuación)

tratamiento	línea celular	
	Factor de CalichDMH de MDAMB435/neo	Factor de CalichDMH de MDAMB435/5T4
A3-ActBut-CalichDMH	0,17 - 0,25	0,4 - 17
Selectividad: H8=8; hP67.6=1; A1=93; A3=1,6 CalichDMH, caliqueamicina no conjugada huH8-AcBut-CalichDMH, anticuerpo H8 humanizado conjugado con caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut) CMA-676, conjugado de anti CD33/caliqueamicina A1-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A1 conjugado con caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut) A2-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A2 conjugado con caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut) A3-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A3 conjugado con caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut)		

La citotoxicidad de los conjugados de anti 5T4/caliqueamicina también se ensayó usando un cultivo de células esféricas tridimensional que se asemejaba más estrechamente a un ambiente celular *in vivo*. Los esféricos se realizaron esencialmente de acuerdo con Yuhás y col. (1977) Cancer Res. 37: 3639-3643. Brevemente, se sembraron  $10^5$  células en 5 ml de medio de cultivo en placas de cultivo celular de poliestireno de 60 mm previamente revestidas con 5 ml de agar de uso en cultivo tisular 0,65 % en medio de cultivo (Sigma de St. Louis, Misuri). Las placas se incubaron durante 5-6 días a 37 °C y en CO<sub>2</sub> al 5 % en aire. Se seleccionaron esféricos con un diámetro de 0,2 mm y se colocaron en una placa multipocillo de 24 pocillos. Cada pocillo contenía 0,5 ml de capa inferior de agar, 1 esférico y 1 ml de capa superior de medio de cultivo. Los esféricos se expusieron después a diversas concentraciones (0, 0,091, 0,365, 1,46, 5,86, 23,44, 93,75 y 375 ng de equivalentes de caliqueamicina/ml) de caliqueamicina, CMA-676 y conjugados de anti 5T4/caliqueamicina preparados usando los anticuerpos anti 5T4 A1 y A3 y un engarce AcBut. Ambos conjugados de anti 5T4/caliqueamicina inhibieron significativamente el crecimiento de células MDAMB435/5T4. Véase Figura 8.

### 15 Ejemplo 7

Preparación y propiedades de unión de anticuerpos anti 5T4 quiméricos y humanizados

Se construyeron anticuerpos quiméricos H8, A1, A2 y A3 que tenían secuencias de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de H8 murinas y regiones constantes de cadena pesada de IgG4 humanas y regiones constantes de cadena ligera kappa humanas. La cisteína presente en la posición 67 de la región variable de cadena pesada de A1 se cambió opcionalmente a fenilalanina, y la cisteína presente en la posición 91 de la región variable de cadena pesada de A3 se cambió opcionalmente a tirosina. Estas variantes se exponen en SEC ID N°: 2 (VH A1) y SEC ID N°: 10 (VH A3). La presencia o ausencia de secuencias intrónicas y el reemplazo de restos de cisteína no afectó a la expresión del anticuerpo. Para clonar secuencias que codificaban regiones constantes de IgG, se suprimieron opcionalmente secuencias intrónicas.

Se preparó H8 humanizado como se ha descrito en la Publicación Internacional de PCT N°: WO 2006/031653. Se prepararon anticuerpos A1 humanizados por injertos de CDR como se describe adicionalmente posteriormente en el presente documento. Las CDR de los anticuerpos A1, A2 y A3 murinos se identificaron usando la definición de AbM, que se basa en la variabilidad de secuencia así como la localización de las regiones de bucle estructurales. En general, se seleccionaron marcos conservados aceptores humanos basándose en que fueran sustancialmente similares a las regiones marco conservadas de los anticuerpos murinos, o que fueran más similares a la secuencia consenso de la subfamilia de región variable. También se tuvo en consideración la representación de los loci de marco conservado en seres humanos, de modo que se prefirieron en general secuencias ampliamente representadas frente a secuencias menos habituales. Se realizaron mutaciones adicionales de las secuenciasceptoras de marco conservado humano para restaurar restos murinos que se cree que están implicados en contactos de antígeno y/o restos implicados en la integridad estructural del sitio de unión a antígeno. La secuencia de aminoácidos también puede optimizarse para preferencia codónica de las células CHO y para retirar sitios de enzimas de restricción. Puede usarse un programa de predicción de estructura peptídica para analizar las secuencias de región variable pesada y ligera humanizadas para identificar y evitar sitios de modificación de proteínas post traduccionales introducidos por el diseño de humanización.

Se construyó una región variable de cadena pesada de A1 humanizada (VH A1 versión 1.0) para incluir las CDR de A1 murino injertado en una región marco conservada DP-21 humana (subgrupo VH7, N° de Referencia CAA43346, SEC ID N°: 88), que contiene una mutación de marco conservado (S82A) y una retromutación (E46K). Se

prepararon variantes retirando la retromutación (VH A1 versiones 1.1 y 1.2). Se preparó una segunda región variable de cadena pesada de A1 humanizada injertando dos CDR de A1 en una región marco conservada de línea germinal DP-54 humana (VH A1 versión 2.0). Se realizaron seis (6) retromutaciones para producir VH A1 versión 2.1. Como se describe adicionalmente posteriormente, ambas regiones variables de cadena pesada de A1 conservaron las propiedades de unión a 5T4. Las regiones marco conservadas de DP-21 y DP-54 muestran 63 % de identidad de secuencia de aminoácidos a lo largo de su longitud, lo que indica que pueden realizarse numerosos cambios de aminoácidos conservando a la vez la especificidad de unión del anticuerpo, incluyendo la capacidad para unirse con un epítipo particular. Se muestra la similitud de las regiones variables de cadena pesada de A1 humanizadas en la Tabla 10. Se exponen secuencias de nucleótidos representativas que codifican regiones variables de cadena pesada de A1 humanizadas como SEC ID N°: 48, 50, 53, y 55. Se exponen secuencias de aminoácidos representativas de regiones variables de cadena pesada de A1 humanizadas como SEC ID N°: 49, 51, 52, 54 y 56. Véase también Figuras 9A-9B.

Se construyó una región variable de cadena ligera de A1 humanizada para incluir las CDR de A1 murino injertadas en regiones marco conservadas de línea germinal humanas DPK24 (subgrupo VKIV), DPK9 (subgrupo VKI), y DPK23 (subgrupo VKIII). Después de la incorporación de una retromutación S67Y en la región variable de cadena ligera de A1 humanizada los marcos conservados preparados con cada uno de estos marcos conservados demostraron unión con 5T4. Véase posteriormente, incluyendo Tabla 13. La región marco conservada de DPK24 muestra 74 % y 73 % de identidad de secuencia de aminoácidos sobre su longitud con DPK9 y DPK23, respectivamente. La región marco conservada DPK9 muestra 74 % de identidad de secuencias de aminoácidos sobre su longitud con DPK23. La similitud de las regiones variables de cadena ligera de A1 humanizadas se muestra en la Tabla 10. Las múltiples versiones de regiones marco conservadas variables de cadena ligera humanizadas demuestran que pueden realizarse numerosos cambios de aminoácidos conservando a la vez la especificidad de unión del anticuerpo, incluyendo la capacidad para unirse con un epítipo particular. Se exponen secuencias de nucleótidos representativas que codifican regiones variables de cadena ligera de A1 humanizadas como SEC ID N°: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73 y 75. Se exponen secuencias de aminoácidos representativas de regiones variables de cadena ligera de A1 humanizadas como SEC ID N°: 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74 y 76. Véase también Figuras 9C-9F.

Tabla 10

Relación de anticuerpos A1 humanizados	
1ª Región variable / 2ª Región variable	Porcentaje de identidad
VL HuA1 v1.1 (SEC ID N°: 60) / Proteína VL HuA1 v2.4 (SEC ID N°: 70)	86 %
VL HuA1 v1.1 (SEC ID N°: 60) / Proteína VL HuA1 v3.1 (SEC ID N°: 75)	86 %
proteína VL HuA1 v2.4 (SEC ID N°: 70) / proteína VL HuA1 v3.1 (SEC ID N°: 75)	85 %
proteína VH HuA1 v1.1 (SEC ID N°: 52) / proteína VH HuA1 v2.0 (SEC ID N°: 54)	78 %

Se diseñaron anticuerpos A2 y A3 humanizados usando una estrategia similar. Se exponen secuencias de aminoácidos representativas de regiones variables de cadena pesada de A2 humanizadas y regiones variables de cadena ligera de A2 humanizadas como SEC ID N°: 77-78 y SEC ID N°: 79-80, respectivamente. Véase también Figura 9G. Se exponen secuencias de aminoácidos representativas de regiones variables de cadena pesada de A3 humanizadas y regiones variables de cadena ligera de A3 humanizadas como SEC ID N°: 81-82 y SEC ID N°: 83-84, respectivamente. Véase también Figura 9H.

Para evaluar la novedad de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de A1, A2 y A3 humanizadas, se realizaron análisis de BLASTn y BLASTp como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11

Análisis de BLASTn y BLASTp		
Secuencia de consulta	Identidad (%) de Secuencia objeto más cercana	Descripción de la secuencia objeto más cercana
ADN de VL A1 humanizada versión 1.1 (SEC ID N°: 59)	83 %*	DEFINICIÓN ARNm parcial de <i>Homo sapiens</i> para región variable de cadena kappa de inmunoglobulina (gene IGKV2)  REFERENCIA AM040532
Proteína VL A1 humanizada versión 1.1 (SEC ID N°: 60)	82 %	DEFINICIÓN precursor B17 de región V-IV de cadena kappa de Ig  REFERENCIA P06314
ADN de VL A1 humanizada versión 2.4 (SEC ID N°: 69)	85 %*	DEFINICIÓN ARNm de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina anti virus de la rabia clon SC4064 de <i>Homo sapiens</i> , Cds completo.  REFERENCIA AY942044
Proteína VL A1 humanizada versión 2.4 (SEC ID N°: 70)	92 %	DEFINICIÓN región V de cadena kappa de inmunoglobulina humanizada anti integrina alfa 4.  REFERENCIA AAA62146
ADN de VL A1 humanizada versión 3.1 (SEC ID N°: 75)	84 %*	DEFINICIÓN ARNm de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina anti toxoide del tétanos clon 136e06 de <i>Homo sapiens</i> (IGL@), cds parcial.  REFERENCIA AY867377
Proteína VL A1 humanizada versión 3.1 (SEC ID N°: 76)	84 %	DEFINICIÓN anticuerpo scFv anti- <i>Burkholderia mallei</i> [Construcción sintética].  REFERENCIA ABI97018
ADN de VH A1 humanizada versión 1.1 (SEC ID N°: 50)	88 %*	DEFINICIÓN ARNm de región variable de cadena pesada de IgA ID:CLL097 de <i>Homo sapiens</i> , Cds parcial.  REFERENCIA AF021940
Proteína VH A1 humanizada versión 1.1 (SEC ID N°: 51)	90 %	DEFINICIÓN región variable de cadena pesada de IgA [ <i>Homo sapiens</i> ].  REFERENCIA AAC09074
ADN de VH A1 humanizada versión 2.0 (SEC ID N°: 53)	81 %*	DEFINICIÓN ARNm de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina clon 23u-45 de <i>Homo sapiens</i> (IGH) cds parcial.  REFERENCIA AF062241

(continuación)

Análisis de BLASTn y BLASTp		
Secuencia de consulta	Identidad (%) de Secuencia objeto más cercana	Descripción de la secuencia objeto más cercana
Proteína VH A1 humanizada versión 2.0 (SEC ID N°: 54)	77 %	DEFINICIÓN cadena D, Información sobre la señalización Erbb de la estructura del complejo Erbb2-Pertuzumab. REFERENCIA 1S78_D
Proteína VL A2 humanizada versión 1.0 (SEC ID N°: 79)	87 %	DEFINICIÓN cadena A, estructura cristalina del fragmento Fab de una aglutinina fría Igm monoclonal humana. REFERENCIA 1QLR_A
Proteína VL A2 humanizada versión 2.0 (SEC ID N°: 80)	83 %	DEFINICIÓN cadena ligera de inmunoglobulina kappa 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]. REFERENCIA AAD29608
Proteína VH A2 humanizada versión 1.0 (SEC ID N°: 77)	88 %	DEFINICIÓN cadena A, la estructura cristalina de un anticuerpo humanizado Fv 528. REFERENCIA 1WT5_A
Proteína VH A2 humanizada versión 2.0 (SEC ID N°: 78)	78 %	DEFINICIÓN cadena D, información sobre la señalización de Erbb de la estructura del complejo Erbb2-Pertuzumab. REFERENCIA 1S78_D
Proteína VL A3 humanizada versión 1.0 (SEC ID N°: 83)	85 %	DEFINICIÓN región VLJ de cadena ligera kappa de inmunoglobulina [ <i>Homo sapiens</i> ]. REFERENCIA BAC01708
Proteína VL A3 humanizada versión 2.0 (SEC ID N°: 84)	90 %	DEFINICIÓN HerMel [construcción sintética]. REFERENCIA CAL47329
Proteína VH A3 humanizada versión 1.0 (SEC ID N°: 81)	79 %	DEFINICIÓN proteína Igh-1a [ <i>Mus musculus</i> ]. REFERENCIA AAH80671
Proteína VH A3 humanizada versión 2.0 (SEC ID N°: 82)	77 %	DEFINICIÓN proteína Igh-1a [ <i>Mus musculus</i> ]. REFERENCIA AAH80671
* Cuando la cobertura de consulta = 100 %		

Las Figuras 10A-10B muestran secuencias de región variable de cadena pesada adicionales que pueden usarse como marcos conservados para la preparación de anticuerpos anti-5T4 A1, A2 y A3. Las Figuras 11-13 muestran secuencias de región variable de cadena ligera adicionales que pueden usarse como un marco conservado para la preparación de anticuerpos anti-5T4 A1, A2 y A3 humanizados. La Figura 14 muestra regiones constantes representativas que pueden usarse para la preparación de anticuerpos anti-5T4 A1, A2 y A3 humanizados y quiméricos.

Para evaluar la especificidad y afinidad de unión de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 quiméricos y humanizados, se realizó análisis de BIACORE® usando antígeno 5T4 humano inmovilizado en una microplaca CM5. Véase Ejemplo 2. Los resultados para anticuerpos A1, A2 y A3 quiméricos se muestran en la Tabla 12 dada a continuación.

Tabla 12

Resultados de ensayo de BIACORE®				
Anticuerpo	KD (M)	KA (1/M)	kd (1/s)	ka (1/Ms)
H8 humanizado	$1,5 \times 10^{-10}$	$6,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^5$
A1 Quimérico	$4,4 \times 10^{-10}$	$2,3 \times 10^9$	$6,7 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^5$
A2 Quimérico	$1,8 \times 10^{-9}$	$5,7 \times 10^8$	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^5$
A3 Quimérico	$\sim 1,8 \times 10^{-10}$	$\sim 5,4 \times 10^9$	$\sim 1,0 \times 10^{-5}$	$\sim 5,4 \times 10^4$
A1 Quimérico + C67F	$3,8 \times 10^{-10}$	$2,6 \times 10^9$	$6,3 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^5$
A3 Quimérico + C91Y	$5,9 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^4$

5 En general, la quimerización/humanización aumentó la afinidad de H8, A1, A2 y A3 por 5T4 humano. Compárese Tabla 3. El aumento de las afinidades de unión parece resultar principalmente de una disociación más lenta del anticuerpo y el antígeno en lugar de una asociación más rápida. Los anticuerpos A2 y A3 quiméricos mostraron las propiedades de unión más mejoradas después de la quimerización.

10 Todas las regiones variables de cadena pesada de A1 humanizadas conservaron las propiedades de unión con 5T4 además, la retirada de la retromutación K46 de la región variable de cadena pesada de A1 humanizada no afectó a las propiedades de unión con 5T4. Las regiones variables de cadena ligera de A1 humanizadas mostraron propiedades de unión con 5T4 deterioradas. Las regiones variables de cadena ligera de A1 humanizadas construidas usando marcos conservados de DPK9 y DPK23 se unieron con 5T4 con mayor afinidad que las regiones variables de cadena ligera de A1 humanizadas construidas usando marcos conservados de DPK24. Se incorporaron retromutaciones para restaurar y/u optimizar la unión con 5T4. El reemplazo del resto de serina en la posición 67 con un resto de tirosina, como se ve en la región marco conservada de A1 murina, restauró completamente las propiedades de unión a antígeno 5T4. Véase Tabla 13.

15

Tabla 13

Inhibición de la unión del anticuerpo A1 quimérico biotilado con 5T4 humano por ELISA	
Anticuerpo Versión A1	CI <sub>50</sub>
A1 Quimérico	16-20 nM
V <sub>H</sub> huA1 v2.0 + V <sub>L</sub> huA1 v1.1	>1 μM
V <sub>H</sub> huA1 v2.0 + V <sub>L</sub> huA1 v1.1	28 nM
V <sub>H</sub> huA1 v2.0 + V <sub>L</sub> huA1 v2.0	>1 μM
V <sub>H</sub> huA1 v2.0 + V <sub>L</sub> huA1 v2.4	16 nM
V <sub>H</sub> huA1 v2.0 + V <sub>L</sub> huA1 v3.0	>1 μM
V <sub>H</sub> huA1 v2.0 + V <sub>L</sub> huA1 v3.1	27 nM
huA1, A1 humanizado v, versión	

### Ejemplo 8

Reactividad cruzada entre especies de anticuerpos Anti-5T4

20 La reactividad entre especies de anticuerpos anti-5T4 desvelados en el presente documento se ensayó para determinar especies relevantes para estudios de eficacia *in vivo* y análisis de toxicología. La correlación de la

actividad de unión y la relación de los diferentes ectodominios de 5T4 también se usaron para describir adicionalmente el epítipo con el que se une cada anticuerpo. Se realizaron ensayos de unión usando ectodominios de 5T4 de diversas especies fusionados con Fc IgG1 humano. El porcentaje de identidad de cada región de ectodominio con 5T4 humano se muestra en la Tabla 14.

5 Tabla 14

Relación de 5T4 de diferentes especies		
Especie	Porcentaje de identidad con 5T4 humano	Aminoácidos del Ectodominio
Ser humano	100	1-355
Ratón	84,0	1-361 <sup>a</sup>
Rata	83,1	1-361 <sup>a</sup>
Chimpancé (secuencia parcial-396/420 aminoácidos)	~99,5	1-355
Mono Cynomolgus	96,7	1-355
Tití de cola negra (secuencia parcial-367/420 aminoácidos)	~94,6	1-355
Perro	87,9	1-355
Vaca	86,9	1-355
<sup>a</sup> Contiene repetición directa de 6 aminoácidos dentro del dominio hidrófilo		

10 Las secuencias de longitud completa o parciales de 5T4 de ser humano, ratón, rata, perro y vaca se han desvelado previamente como los N° de referencia de GenBank Z29083 (ser humano, SEC ID N°: 87), AJ012160 (ratón), BC087011 (rata), XM539020 (perro) y XM593502 (vaca). Se generó una secuencia parcial virtual de 5T4 de chimpancé usando un alineamiento de ARNm y secuencias genómicas. Se aislaron ácidos nucleicos que codificaban proteínas de 5T4 de mono cynomolgus y tití de cola negra. Se muestran las secuencias de aminoácidos de estos antígenos 5T4 adicionales en la Figura 15 y también se exponen como SEC ID N°: 86 (mono cynomolgus) y SEC ID N°: 85 (tití de cola negra).

15 Para evaluar la novedad de las secuencias de mono cynomolgus y tití de cola negra se realizaron análisis de BLAST como se ha descrito en el Ejemplo 2. Cuando se usó la secuencia de aminoácidos de 5T4 de tití de cola negra de longitud completa como una secuencia de consulta, la secuencia objeto más cercana se identificó como 5T4 humano (N° de referencia de GenBank NP\_006661.1), con 94 % de identidad (302/320 aminoácidos). Las secuencias también difirieron en el extremo carboxilo terminal, no alineándose los aminoácidos 1-19 de SEC ID N°: 85 con la secuencia objeto más cercana. Cuando se usó la secuencia de aminoácidos de 5T4 de mono cynomolgus de longitud completa como una secuencia de consulta, se identificó la secuencia objeto no virtual más cercana como un precursor de glucoproteína de trofoblastos también de mono cynomolgus (N° de Referencia de GenBank BAE00432.1), con 99 % identidad (364/366 aminoácidos). Las secuencias también difirieron en el extremo carboxilo terminal, no alineándose los aminoácidos 1-25 de SEC ID N°: 86 con la secuencia objeto no virtual más cercana.

25 Para ensayar la unión de anticuerpos anti-5T4, se transfectaron transitoriamente con proteínas de fusión Fc/ectodominio de 5T4 células COS-1, y se realizaron ensayos ELISA. Se usaron anticuerpos IgG4 e IgG1 humanos no relevantes, como controles. La reactividad entre especies de los anticuerpos anti-5T4 se resume en la Tabla 15.

Tabla 15

Reactividad cruzada de anticuerpos Anti-5T4 (DE50 en nM)					
	huH8 $\gamma$ 4	huH8 $\gamma$ 1	ChiA1 $\gamma$ 4	ChiA2 $\gamma$ 4	ChiA3 $\gamma$ 4
Ser humano	0,19	0,20	0,28	0,21	0,20
Chimpancé	0,19	0,22	0,27	0,22	0,20
Tití de cola negra	+/-	+/-	0,24	0,22	-

(continuación)

Reactividad cruzada de anticuerpos Anti-5T4 (DE50 en nM)					
	huH8 $\gamma$ 4	huH8 $\gamma$ 1	ChiA1 $\gamma$ 4	ChiA2 $\gamma$ 4	ChiA3 $\gamma$ 4
mono cynomolgus	-	-	0,18	0,18	0,23
rata	-	-	+/-	-	-
ratón	-	-	-	-	-
huH8 $\mu$ 4, anticuerpo H8 humanizado que tiene regiones constantes de IgG4 huH8 $\mu$ 1, anticuerpo H8 humanizado que tiene regiones constantes IgG1 ChiA1 $\mu$ 4, anticuerpo A1 quimérico que tiene regiones constantes IgG4 ChiA2 $\mu$ 4, anticuerpo A2 quimérico que tiene regiones constantes IgG4 ChiA3 $\mu$ 4, anticuerpo A3 quimérico que tiene regiones constantes IgG4 (+/-), unión parcial (-), sin unión					

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> WYETH  
 Boghaert, Erwin  
 Damle, Nitin  
 Hamann, Philip  
 Khandke, Kiran
- 10 Kunz, Arthur  
 Marquette, Kimberly  
 Tchistiakova, Lioudmila  
 Gill, Davinder  
 Sreekumar, Kodangattil
- 15 <120> ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> 040000-0359813
- 20 <140>  
 <141>
- <150> 60/891.248  
 <151> 23-02-2007
- 25 <150> 60/781.346  
 <151> 10-03-2006
- <160> 99
- 30 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1  
 <211> 414  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (57)  
 <223> secuencia líder
- 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (58) .. (414)

ES 2 498 517 T3

<223> región variable de cadena pesada

<220>  
 <221> misc\_difference  
 5 <222> (260) .. (260)  
 <223> n e s g o t

<400> 1

	atggattggc tgtggaactt gctattcctg atggcagctg cccaagtat ccaagcacag	60
	atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc	120
	tgcaaggctt ctggatatac cttcacaaac tttggaatga actgggtgaa gcaggggtcca	180
	ggagaggggtt taaagtggat gggctggata aacaccaaca ctggagagcc aagatatgct	240
	gaagagttca agggacggtn tgccttttct ttggaaacca ctgccagcac tgcctatttg	300
	cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag agactgggac	360
10	gggtgectact tctttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca	414

<210> 2  
 <211> 138  
 15 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (1) .. (19)  
 <223> secuencia líder

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <222> (20) .. (138)  
 <223> región variable de cadena pesada

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (45) .. (54)  
 <223> CDR1

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 35 <222> (69) .. (85)  
 <223> CDR2

<220>  
 <221> MUTÁGENO  
 40 <222> (87)..(87)  
 <223> Xaa es cisteína (C) o fenilalanina (F); esta es la posición 67 con la numeración de acuerdo con Kabat

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 45 <222> (118)..(127)  
 <223> CDR3

<400> 2

ES 2 498 517 T3

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser  
 1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Asn Phe Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Gly Pro Gly Glu Gly Leu  
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Xaa Ala Phe Ser Leu Glu Thr Thr Ala Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Trp Asp Gly Ala Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp  
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130 135

- <210> 3
- <211> 381
- 5 <212> ADN
- <213> *Mus musculus*
- <220>
- <221> misc\_feature
- 10 <222> (1) .. (60)
- <223> secuencia líder
- <220>
- <221> misc\_feature
- 15 <222> (61) .. (381)
- <223> región variable de cadena ligera
- <400> 3

ES 2 498 517 T3

```

atgaagtcac agaccaggt ctctgattt ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg      60
agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgttt cagcaggaga cagggtgacc      120
ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca      180
gggcagtctc ctaaactggt gataaacttt gcaaccaatc gctacactgg agtccctaata      240
cgcttcaactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct      300
gaagacctgg cactttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtggac gttcggtgga      360
ggcaccaagc tggaaatcaa a                                               381

```

```

5  <210> 4
   <211> 127
   <212> PRT
   <213> Mus musculus

10 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (1)..(20)
   <223> secuencia líder

15 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (21)..(127)
   <223> región variable de cadena ligera

20 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (44)..(54)
   <223> CDR1

25 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (70)..(76)
   <223> CDR2

30 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (109)..(117)
   <223> CDR3

<400> 4

```

ES 2 498 517 T3

Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu  
 20 25 30

Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45

Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Asn Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asn  
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
 85 90 95

Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr  
 100 105 110

Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

<210> 5  
 <211> 405  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1).. (54)  
 <223> secuencia líder

10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (55).. (405)  
 <223> región variable de cadena pesada

<400> 5

atggaatgga ggatctttct cttcatcctg tcaggaactg caggtgtcca ctcccaggtt 60  
 cagctgcagc agtctagacc tgagctgggtg aagcctgggg cttcagtgaa gatgtcctgc 120  
 aaggcttctg gatacacttt cactgactat gttataagct gggatgaagca gagaactgga 180  
 cagggccttg agtggattgg agagatttat cctggaagta atagtattta ttacaatgag 240  
 aagttcaagg gcagggccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300  
 ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaatggg gggtactac 360  
 ggctttgact attggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

20

<210> 6  
<211> 135  
<212> PRT  
5 <213> *Mus musculus*

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (18)  
10 <223> secuencia líder

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (19) .. (135)  
15 <223> región variable de cadena pesada

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (44) .. (53)  
20 <223> CDR1

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (68) .. (84)  
25 <223> CDR2

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (117) .. (124)  
30 <223> CDR3

<400> 6

ES 2 498 517 T3

Met Glu Trp Arg Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val  
 1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro  
 20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 35 40 45

Asp Tyr Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu  
 50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Asn Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu  
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr  
 100 105 110

Phe Cys Ala Met Gly Gly Asn Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130 135

- <210> 7
- <211> 390
- 5 <212> ADN
- <213> *Mus musculus*
  
- <220>
- <221> misc\_feature
- 10 <222> (1)..(66)
- <223> secuencia líder
  
- <220>
- <221> misc\_feature
- 15 <222> (67)..(390)
- <223> región variable de cadena ligera
  
- <400> 7

ES 2 498 517 T3

```

atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc      60
agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg      120
gtcaccttga cctgcactgc cagctcaagt gtaaattcca attacttaca ctggtaccag      180
cagaagccag gatcctcccc caaactctgg atttatagca catccaacct ggcttctgga      240
gtcccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc      300
atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt atcatcgttc cccgctcacg      360
ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa                                         390

```

```

5 <210> 8
   <211> 130
   <212> PRT
   <213> Mus musculus

10 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (1) .. (22)
   <223> secuencia líder

15 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (23) .. (130)
   <223> región variable de cadena ligera

20 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (46) .. (56)
   <223> CDR1

25 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (73) .. (79)
   <223> CDR2

30 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (112)..(120)
   <223> CDR3

<400> 8

```

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15

```

```

35 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
           20           25           30

```

ES 2 498 517 T3

Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Asn Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60

Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
 65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
 85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His  
 100 105 110

Gln Tyr His Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125

Leu Lys  
 130

<210> 9  
 <211> 423  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(57)  
 <223> secuencia líder

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (58)..(423)  
 <223> región variable de cadena pesada

<220>  
 <221> misc\_difference  
 <222> (347)..(347)  
 <223> n e s g o a

<400> 9

atgctggttg ggctgaagtg ggttttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag 60

gtgcagcttg ttgagtctgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcaatacc tacgccatga actgggtccg ccaggctcca 180

ggaaaggggt tggaatgggt tgctcgcata agaagtaaaa gtaataatta tgcaacatat 240

ES 2 498 517 T3

```
tatgccgatt cagtgaaaga caggttcacc atctccagag atgattcaca aagcatgctc 300
tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgaa gacacagcca tgtattnctg tgtgagacag 360
tgggattacg acgtcagggc tatgaactac tggggtcaag gaacctcagt cacccgtctc 420
tca 423
```

```
5 <210> 10
   <211> 141
   <212> PRT
   <213> Mus musculus

10 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (1) .. (19)
   <223> secuencia líder

15 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (20) .. (141)
   <223> región variable de cadena pesada

20 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (45) .. (54)
   <223> CDR1

25 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (69) .. (87)
   <223> CDR2

30 <220>
   <221> MUTÁGENO
   <222> (116)..(116)
   <223> Xaa es cisteína (C) o tirosina (Y); esta es la posición 91 con la numeración de acuerdo con Kabat

35 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (120)..(130)
   <223> CDR3

<400> 10
```

```
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
 1           5           10           15
```

```
Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30
```

```
40 Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      35           40           45
```

ES 2 498 517 T3

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr  
 65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
 85 90 95

Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr  
 100 105 110

Ala Met Tyr Xaa Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met  
 115 120 125

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 11  
 <211> 381  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (60)  
 <223> secuencia líder

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (61) .. (381)  
 <223> región variable de cadena ligera

<400> 11

atggagacac attctcaggt ctttgtatac atgttgctgt ggttgtctgg tgttgaagga 60  
 gacattgtga tgaccagtc tcacatattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120  
 atcacctgca aggccagtca ggatgtggat actgctgtag cctgggatca acagaaacca 180  
 gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccacc ggctcactgg agtccctgat 240  
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacggat ttcactetca ccattagcaa tgtgcagtct 300  
 gaagacttg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagct atccgtacac gttcggaggg 360  
 gggaccaagc tggaaataaa a 381

<210> 12  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (20)

ES 2 498 517 T3

<223> secuencia líder

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (21) .. (127)

<223> región variable de cadena ligera

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (44) .. (54)

<223> CDR1

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (70) .. (76)

<223> CDR2

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (109)..(117)

<223> CDR3

<400> 12

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser  
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Asp Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

25

<210> 13

<211> 98

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 498 517 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 14  
 <211> 98  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 15  
 <211> 98  
 15 <212> PRT

ES 2 498 517 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

5 Ala Arg

<210> 16

<211> 98

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 498 517 T3

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 17  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 17

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

10

<210> 18

ES 2 498 517 T3

<211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu  
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Thr

10 <210> 19  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 19

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

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

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

ES 2 498 517 T3

Gly Trp Ile Thr Pro Phe Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

5 <210> 20  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 20

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

10 Ala Arg

15 <210> 21  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 21

ES 2 498 517 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Ala

<210> 22  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

10

<210> 23

ES 2 498 517 T3

<211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 23

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

10 <210> 24  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 24

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

ES 2 498 517 T3

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Thr

5 <210> 25  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> secuencia consenso de marco conservado 1 de región variable de cadena pesada VH1 humana  
 <400> 25

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

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

15 <210> 26  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> marco conservado 2 de región de variable de cadena pesada VH1 humana  
 <400> 26

25 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

30 <210> 27  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> marco conservado 3 de región de variable de cadena pesada VH1 humana  
 <400> 27

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15

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

ES 2 498 517 T3

<210> 28  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 28

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro  
100

10 <210> 29  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 29

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

ES 2 498 517 T3

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80

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

Thr Val

<210> 30  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 30

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80

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

Thr Val

<210> 31  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

15

<400> 31

ES 2 498 517 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95

<210> 32  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

10

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 55 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  
 85 90 95

<210> 33  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 33

ES 2 498 517 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Pro Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp His Asn Leu Pro  
 85 90 95

<210> 34  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

Glu Ile Val Met 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 Ser  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80

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

10

<210> 35  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 35

ES 2 498 517 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
 85 90 95

<210> 36  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
 85 90 95

10

<210> 37  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 37

ES 2 498 517 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro  
 85 90 95

<210> 38  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro  
 85 90 95

10

<210> 39  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 39

ES 2 498 517 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro  
 85 90 95

<210> 40  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 40

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro  
 85 90 95

<210> 41  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 41

ES 2 498 517 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro  
 85 90 95

<210> 42  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 42

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro  
 85 90 95

10

<210> 43  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 43

ES 2 498 517 T3

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

<210> 44  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 44

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

10

<210> 45  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 45

ES 2 498 517 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

ES 2 498 517 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

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

ES 2 498 517 T3

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 46  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

10

ES 2 498 517 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

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> 47  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

10

ES 2 498 517 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

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

ES 2 498 517 T3

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

5 <210> 48  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 48  
 cagggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60  
 tctctgcaagg cttctggata taccttcaca aactttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttaagtg gatgggatgg ataaacacca aactgggaga gccaagatat 180  
 gctgaagagt tcaagggacg gtttgtcttc tcttggaca cctctgtcag cactgcctat 240  
 ctgcagatct ccagcctgaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc cagagactgg 300  
 gacgggtgcct acttctttga ctactggggc caaggcacc ttgtcacagt ctctca 357

15 <210> 49  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23) .. (35)  
 <223> CDR1

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50) .. (66)  
 <223> CDR2

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (99)..(108)  
 <223> CDR3

<400> 49



ES 2 498 517 T3

<223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 51

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Ala Glu Glu Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Trp Asp Gly Ala Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> derivada de secuencias humanas y de ratón

15

<400> 52

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

ES 2 498 517 T3

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Trp Asp Gly Ala Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 53  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 53

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggata taccttcaca aactttggaa tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctgg ataaacacca acaccggtga gccaagatat 180  
 gctgaagagt tcaagggacg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac accgctgtgt attactgtgc cagagactgg 300  
 gacggtgccct acttctttga ctactggggc caaggcacc cttgtcacagt ctectca 357

15 <210> 54  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 54



ES 2 498 517 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ala Lys Ser Ser Ala 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 Asp Trp Asp Gly Ala Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 57  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 57

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60  
 atcaactgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca gcagaaacca 120  
 ggacagcctc ctaagctgct catttacttt gcaaccaatc gctacactgg agtccttgac 180  
 cgcttctccg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct 240  
 gaagatgtgg cagtttatta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300  
 ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

15 <210> 58  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

ES 2 498 517 T3

<400> 58

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

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

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

- 5 <210> 59
- <211> 321
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 59

Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys  
 1 5 10 15

15

ES 2 498 517 T3

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr  
 20 25 30

Gly Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys  
 35 40 45

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala  
 50 55 60

Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala  
 65 70 75 80

Gly Ala Gly Thr Gly Thr Gly Ala Gly Thr Ala Ala Thr Gly Ala Thr  
 85 90 95

Gly Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys  
 100 105 110

Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Gly Cys Cys  
 115 120 125

Thr Cys Cys Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr  
 130 135 140

Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala Thr Cys  
 145 150 155 160

Gly Cys Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Cys  
 165 170 175

Thr Gly Ala Cys Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Cys  
 180 185 190

Ala Gly Cys Gly Gly Ala Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly  
 195 200 205

Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr  
 210 215 220

Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr  
 225 230 235 240

ES 2 498 517 T3

Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr  
 245 250 255

Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala  
 260 265 270

Thr Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly  
 275 280 285

Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala  
 290 295 300

Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala  
 305 310 315 320

Ala

<210> 60  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

10

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

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

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

15 <210> 61

ES 2 498 517 T3

<211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 61

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca      120
ggcaaagccc ctaagctcct gatctatfff gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc      180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctcctggac cttcggtcag      300
ggcaccaagg tggaaatcaa a                                               321
    
```

10 <210> 62  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

20 <400> 62

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
           20           25           30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
           85           90           95

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

25 <210> 63  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 498 517 T3

<220>  
<223> derivada de secuencias humanas y de ratón

5 <400> 63

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtc gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca      120
ggcaaatccc ctaagctcct gatctatctt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc      180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctcctggac cttcggtcag      300
ggcaccaagg tggaaatcaa a                                             321

```

10 <210> 64  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 64

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
           20           25           30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
           85           90           95

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

```

20 <210> 65  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> derivada de secuencias humanas y de ratón

ES 2 498 517 T3

<400> 65

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtc gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca      120
ggcaaagccc ctaagctcct gatcaatttt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc      180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag      300
ggcaccaagg tggaaatcaa a                                               321

```

5 <210> 66  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 66

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
           20           25           30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
           85           90           95

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

```

15 <210> 67  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

25 <400> 67

ES 2 498 517 T3

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc      60
atcaacttgca aggccagtc gagtgtgagt aatgatgtgg cttgggatca gcagaaacca      120
ggcaaagccc ctaagctcct gatctatctt gcaaccaatc gctacactgg agtcccaaac      180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct      240
gaagatcttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag      300
ggcaccaagg tggaaatcaa a                                                  321

```

5 <210> 68  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 68

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
          20              25              30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
          85              90              95

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

```

15 <210> 69  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 69

ES 2 498 517 T3

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtc gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca      120
ggcaaagccc ctaagctcct gatctatctt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc      180
cgcttcagcg gcagcggata cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct      240
gaagatcttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag      300
ggcaccaagg tggaaatcaa a                                               321

```

5 <210> 70  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 70

```

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

```

15 <210> 71  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 71

ES 2 498 517 T3

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgca aggccagtc gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca 120  
 ggcaaagccc ctaagctcct gatctatctt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc 180  
 cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactttca ccatcagcag cctgcaacct 240  
 gaagatcttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300  
 ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 72  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 72

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 73  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 73

ES 2 498 517 T3

gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtccctgt ctccaggcga aagagccacc 60  
 ctctcctgca aggccagtca gagggtgagt aatgatgtgg cttggtacca gcagaaacct 120  
 gggcaggctc ccaggctgct gatctatfff gcaaccaatc gctacactgg catcccagcc 180  
 cgcttctccg gcagcggctc cggcacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300  
 ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

5 <210> 74  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 74

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

15 <210> 75  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 75

ES 2 498 517 T3

gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtccctgt ctccaggcga aagagccacc 60  
 ctctcctgca aggccagtca gagggtgagt aatgatgtgg cttggtacca gcagaaacct 120  
 gggcaggctc ccaggctgct gatctatfff gcaaccaatc gctacactgg catcccagcc 180  
 cgcttctccg gcagcggcta cggcacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac ctteggtcag 300  
 ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

5 <210> 76  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 76

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

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

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

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

15 <210> 77  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 77

ES 2 498 517 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Asn Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 78  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón  
 <400> 78

ES 2 498 517 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Asn Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Gly Gly Asn Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 79  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

10

<400> 79

ES 2 498 517 T3

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 Thr Ala Ser Ser Ser Val Asn Ser Asn  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

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

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

<210> 80  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

10

<400> 80

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Asn Ser Asn  
 20 25 30

ES 2 498 517 T3

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro  
 85 90 95

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

<210> 81  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

10

<400> 81

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

ES 2 498 517 T3

<210> 82  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

<400> 82

10

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 83  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

20

<400> 83

ES 2 498 517 T3

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

<210> 84  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> derivada de secuencias humanas y de ratón

10

<400> 84

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

ES 2 498 517 T3

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

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

5 <210> 85  
 <211> 367  
 <212> PRT  
 <213> ifti

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(29)  
 <223> secuencia líder

15 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (30)..(367)  
 <223> péptido maduro - secuencia parcial

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (30)..(356)  
 <223> ectodominio

<400> 85

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asn Gly Arg Leu  
 -25 -20 -15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser  
 -10 -5 -1 1

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu  
 5 10 15

Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Leu Leu Pro Gly Gln Cys Pro Ala  
 20 25 30 35

Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg  
 40 45 50

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Pro Tyr Val Arg Asn Leu  
 55 60 65

25 Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala  
 70 75 80

ES 2 498 517 T3

Arg Val Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser  
85 90 95

Arg Leu Glu Asp Val Gln Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu  
100 105 110 115

Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Val Leu Ser Pro Phe  
120 125 130

Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu Val  
135 140 145

Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Asn Asn  
150 155 160

Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Arg Ala Gly Gly Ala  
165 170 175

Leu His Gly Leu His Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr  
180 185 190 195

Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asp  
200 205 210

Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn  
215 220 225

Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val  
230 235 240

Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Val Arg  
245 250 255

Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp  
260 265 270 275

Met Val Ala Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Tyr Gln  
280 285 290

Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu  
295 300 305

ES 2 498 517 T3

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu  
 310 315 320

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly  
 325 330 335

5 <210> 86  
 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> mono Cynomologous

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(29)  
 <223> secuencia líder

15 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (30)..(420)

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (30)..(356)  
 <223> ectodominio

<400> 86

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu  
 -25 -20 -15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser  
 -10 -5 -1 1

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu  
 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro Ala  
 20 25 30 35

Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg  
 40 45 50

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Leu Tyr Val Arg Asn Leu  
 55 60 65

25 Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala  
 70 75 80

ES 2 498 517 T3

Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser  
85 90 95

Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu  
100 105 110 115

Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Tyr Leu Ser Pro Phe  
120 125 130

Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Ile Ser Ala Pro Ser Pro Leu Val  
135 140 145

Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Asp Asp Lys Arg Gln Asn  
150 155 160

Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Ala Ala Ala Leu Val Ala Gly Arg Ala  
165 170 175

Leu Gln Gly Leu His Leu Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr  
180 185 190 195

Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg Tyr Leu Asp  
200 205 210

Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn  
215 220 225

Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val  
230 235 240

Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Val Arg  
245 250 255

Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp  
260 265 270 275

Met Val Thr Trp Leu Lys Gln Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Asp Arg  
280 285 290

Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu  
295 300 305

ES 2 498 517 T3

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu  
 310 315 320

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala  
 325 330 335

Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp  
 340 345 350 355

Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His  
 360 365 370

Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser  
 375 380 385

Asn Ser Asp Val  
 390

<210> 87  
 <211> 420  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 87

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu  
 1 5 10 15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu  
 35 40 45

Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro Ala  
 50 55 60

Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg  
 65 70 75 80

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn Leu  
 85 90 95

Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala  
 100 105 110

10

ES 2 498 517 T3

Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser  
 115 120 125

Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu  
 130 135 140

Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro Phe  
 145 150 155 160

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

Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln Asn  
 180 185 190

Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Ala  
 195 200 205

Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr  
 210 215 220

Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asp  
 225 230 235 240

Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn  
 245 250 255

Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val  
 260 265 270

Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Ile Arg  
 275 280 285

Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp  
 290 295 300

Met Val Thr Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Asp Arg  
 305 310 315 320

Leu Thr Cys Ala Tyr Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu  
 325 330 335

ES 2 498 517 T3

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu  
 340 345 350

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala  
 355 360 365

Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp  
 370 375 380

Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His  
 385 390 395 400

Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser  
 405 410 415

Asn Ser Asp Val  
 420

<210> 88  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 88

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ser Arg Gly Tyr Ser Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe  
 100 105 110

10

ES 2 498 517 T3

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val  
 115 120 125

Ser Ser  
 130

5 <210> 89  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 89

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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

10 Ala Arg

<210> 90  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 90

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

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

ES 2 498 517 T3

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys

5 <210> 91  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 91

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

10 <210> 92  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 92

ES 2 498 517 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala 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

<210> 93  
 <211> 97  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 93

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 94  
 <211> 95

10

ES 2 498 517 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 94

5

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
           20           25           30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
           85           90           95
    
```

<210> 95  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 95

10

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
           20           25           30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
           85           90           95
    
```

15

<210> 96  
<211> 95  
<212> PRT

ES 2 498 517 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 96

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20           25           30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
          85           90           95

```

5

<210> 97

<211> 95

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 97

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
          85           90           95

```

15

<210> 98

<211> 101

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 98

ES 2 498 517 T3

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro  
 100

<210> 99  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 99

Glu Ile Val Met 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 Ser  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo anti-5T4 aislado, o fragmento del mismo que comprende un dominio de unión a antígeno de, o que se une con el mismo epítipo de 5T4 que, un anticuerpo que comprende:
  - 5 (a) una región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 2 y una región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 4,
  - (b) una región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 10 y una región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 12,
  - (c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4; o
  - 10 (d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, siendo el anticuerpo aislado un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, un fragmento Fv, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de un único dominio o una proteína de fusión.
3. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo monoclonal murino.
4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, teniendo el anticuerpo aislado una afinidad de unión por el antígeno 5T4 humano de al menos  $1 \times 10^{-7}$  M a  $1 \times 10^{-12}$  M como puede determinarse por análisis de resonancia de plasmón superficial.
5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, dirigiéndose el anticuerpo aislado específicamente a células que expresan 5T4 *in vivo*.
6. El anticuerpo aislado de la reivindicación 3, comprendiendo el anticuerpo monoclonal murino una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2 o restos 20-141 de SEC ID N°: 10.
7. El anticuerpo aislado de la reivindicación 3, comprendiendo el anticuerpo monoclonal murino una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4, o los restos 21-127 de SEC ID N°: 12.
8. El anticuerpo aislado de la reivindicación 3, comprendiendo el anticuerpo monoclonal murino una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4.
9. El anticuerpo aislado de la reivindicación 3, comprendiendo el anticuerpo monoclonal murino una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12.
10. El anticuerpo aislado de la reivindicación 2, que es un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado.
11. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 10, que comprende regiones constantes derivadas de regiones constantes humanas.
12. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 11, en el que la región constante de cadena ligera humana deriva de la región constante de cadena ligera kappa humana.
13. El anticuerpo quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 11, en el que la región constante de cadena pesada humana deriva de una región constante de cadena pesada IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.
14. El anticuerpo quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 13, en el que la región constante de cadena pesada IgG4 humana comprende prolina en la posición 241.
15. El anticuerpo quimérico o humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que tiene al menos una región variable de cadena ligera o al menos una región variable de cadena pesada que comprende
  - 50 (a) regiones marco conservadas que comprenden restos de una región marco conservada de anticuerpo humano; y
  - (b) una o más CDR de la región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 4 o 12, o una o más CDR de la región

variable de cadena pesada SEC ID N°: 2 o 10.

16. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 15, en el que los restos humanos son restos marco conservados humanos seleccionados del grupo que consiste en:

- 5 (a) una región marco conservada de cadena pesada de anticuerpo humano seleccionada del grupo que consiste en DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), DP-75, DP-8 (VH1-2), DP-25, VI-2b y VI-3 (VH1-03), DP-15 y V1-8 (VH1-08), DP-14 y V1-18 (VH1-18), DP-5 y V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 y YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH 1-e), DP-3 y DA-8 (VH 1-f);
- 10 (b) una región marco conservada de cadena ligera de anticuerpo humano de un clon de línea germinal de subgrupo IV DPK24, un subgrupo V<sub>κ</sub>III (DPK23, DPK22, DPK20, DPK 21), o un clon de línea germinal de subgrupo V<sub>κ</sub>I (DPK9, DPK1, 02, DPK-7);
- (c) una secuencia consenso de una región marco conservada de cadena pesada de (a); y
- (d) una región marco conservada que es al menos 63 % idéntica a una región marco conservada de (a)-(c).

15 17. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 15 o 16 que comprende al menos dos CDR de una cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 10 o 12.

18. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 17, en el que la cadena ligera del anticuerpo quimérico o humanizado comprende una región variable que comprende al menos dos de las tres CDR de una cualquiera de SEC ID N°: 4 o 12.

20 19. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 18, en el que la cadena ligera del anticuerpo quimérico o humanizado comprende una región variable que comprende tres CDR de una cualquiera de SEC ID N°: 4 o 12.

20. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 15, en el que la cadena pesada del anticuerpo quimérico o humanizado comprenden una región variable que comprende al menos dos de tres CDR de una cualquiera de SEC ID N°: 2 o 10.

25 21. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 20, en el que la cadena pesada del anticuerpo quimérico o humanizado comprende una región variable que comprende tres CDR de una cualquiera de SEC ID N°: 2 o 10.

22. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 15, que comprende las CDR de SEC ID N°: 2 y 4, o las CDR de SEC ID N°:10 y 12.

23. El anticuerpo quimérico o humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 22, en el que la secuencia de región variable de cadena pesada del anticuerpo quimérico o humanizado comprende:

- 30 (a) una secuencia de aminoácidos de los restos 20-138 de SEC ID N°: 2;
- (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a los restos 20-138 de SEC ID N°: 2;
- (c) una secuencia de aminoácidos de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10;
- (d) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a los restos 20-141 de SEC ID N°: 10;
- 35 (e) una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID N°: 49, 51, 52, 54, 56, 81 u 82;
- (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a SEC ID N°: 51;
- (g) una secuencia de aminoácidos que es al menos 78 % idéntica a SEC ID N°: 54;
- (h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a SEC ID N°: 81; o
- (i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 78 % idéntica a SEC ID N°: 82.

40 24. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 10, en el que la secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo quimérico o humanizado comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4;
- (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 94 % idéntica a los restos 21-127 de SEC ID N°: 4;
- (c) una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12;
- (d) una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % idéntica a los restos 21-127 de SEC ID N°: 12;
- 45 (e) una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID N°: 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 83 u 84;
- (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 83 % idéntica a SEC ID N°: 60;
- (g) una secuencia de aminoácidos que es al menos 93 % idéntica a SEC ID N°: 70;
- (h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a SEC ID N°: 76;
- 50 (i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEC ID N°: 83; o
- (j) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a SEC ID N°: 84.

25. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 10, que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 4 y los restos 20-138 de SEC ID N°: 2,
  - (ii) SEC ID N°: 58 y una cualquiera de SEC ID N°: 49, 51, 52, 54, 56,
  - (iii) SEC ID N°: 60 y una cualquiera de SEC ID N°: 49, 51, 52, 54, 56, y
  - (iv) SEC ID N°: 54 y una cualquiera de SEC ID N°: 60, 62, 70, 74, 76.
- 5 26. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 25, que comprende una región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID N°: 54 y una región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID N°: 70.
27. El anticuerpo quimérico o humanizado de la reivindicación 10, que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 21-127 de SEC ID N°: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de los restos 20-141 de SEC ID N°: 10.
- 10 28. Un anticuerpo aislado que se une específicamente con un epítipo de 5T4 humano que comprende los restos 173-252 y 276-355 de SEC ID N°: 87.
29. Un anticuerpo aislado que se une específicamente con un epítipo de 5T4 humano que comprende los aminoácidos 83-163 de SEC ID N°: 87.
30. Un conjugado de anticuerpo/fármaco para suministro farmacológico que comprende:
- 15 (a) el anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29; y  
(b) un fármaco, que está unido directa o indirectamente con el anticuerpo aislado.
31. El conjugado de anticuerpo/fármaco de la reivindicación 30, en el que el fármaco es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en una citotoxina, un radioisótopo, un agente inmunomodulador, un agente anti angiogénico, un agente anti proliferativo, un agente proapoptótico, un agente quimioterapéutico y un ácido nucleico terapéutico.
- 20 32. El conjugado de anticuerpo/fármaco de la reivindicación 31, en el que el agente terapéutico es una citotoxina y en el que la citotoxina es un antibiótico, un inhibidor de polimerización de tubulina, un agente alquilante, un inhibidor de síntesis de proteínas, un inhibidor de proteína quinasa, un inhibidor de fosfatasa, un inhibidor de topoisomerasa o una enzima.
- 25 33. El conjugado de anticuerpo/fármaco de la reivindicación 31, en el que la citotoxina es un antibiótico y en el que el antibiótico es caliqueamicina.
34. El conjugado de anticuerpo/fármaco de la reivindicación 33, en el que la caliqueamicina es un derivado de N-acetilo o análogo de disulfuro de caliqueamicina.
- 30 35. El conjugado de anticuerpo/fármaco de la reivindicación 34, en el que la caliqueamicina es N-acetil- y -caliqueamicina.
36. El conjugado de anticuerpo/fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 35, en el que el fármaco está unido al anticuerpo mediante un engarce.
- 35 37. El conjugado de anticuerpo/fármaco de la reivindicación 36, en el que el engarce se selecciona del grupo que consiste en ácido 4-(4'acetilfenoxi)butanoico (AcBut), ácido 3-acetilfenil ácido (AcPac), ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida), y derivados de los mismos.
38. Uso de un conjugado de anticuerpo anti-5T4/fármaco que comprende (i) el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, y (ii) un agente terapéutico que está unido con el anticuerpo aislado directa o indirectamente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer positivo para 5T4.
- 40 39. El uso de la reivindicación 38, en el que el conjugado de anticuerpo anti-5T4/fármaco es un conjugado de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina, y que comprende además administrar un segundo agente terapéutico, en el que el conjugado de anti-5T4/caliqueamicina y el segundo agente terapéutico se administran de forma concurrente o consecutiva en cualquier orden.
- 45 40. Una célula que expresa un anticuerpo anti-5T4 o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.
41. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-5T4 o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.

FIG. 1A

**VH A1 murina**

ATGGATTGGCTGTGGAACTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTAT  
 CCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTG  
 GAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACTTCACAAAC  
 TTTGGAAATGAACTGGCTGAAGCAGGCTCCAGGAGAGGGTTTAAAGTGGAT  
 GGGCTGGATAAACACCAACACTGGAGAGCCAAGATATGCTGAAGAGTTCA  
 AGGGACGGT (G/T) TGCCTTTTCTTTGGAAACCACTGCCAGCACTGCCATTTG  
 CAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAG  
 AGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTEACTACTGGGGCCAAGGCACCACTC  
 TCACAGTCTCTCA (SEC ID N°: 1)

MDWLNNLLFLMAAAGSIOAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFIN  
PGMNVVKQGPGEGLKWMGWINTNTGEPYAAEFKGR (C/F) AFSLETTASTAYL  
QINNLKNEBTATYFCARDWDGAFFDYWGQGETLTVSS (SEC ID N°: 2)

**VL A1 murina**

ATGAAGTCACAGACCCAGGTCTTCGTATTTCTACTGCTCTGTGTGCTGG  
 TGCTCATGGGAGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTT  
 CAGCAGGAGACAGGGTGACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGT  
 AATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGTT  
 GATBAACCTTTGCAACCAATCGCTACACTGGAGTCCCTAATCGCTTCACTG  
 GCAGTGBATATGGGACGGATTTCACCTTTCACCATCAGCACTGTGCAGGCT  
 GAAGACCTGGCACTTTATTTCTGTTCAGCAGGATTATAGCTCTCCGTGGAC  
 GTTCGGTGGAGGCCAAGCTGGAATCAA (SEC ID N°: 3)

MKSOTQVVFVLLLCVSGAHGSI VMTQTPKPLLVSAGDRVTTTCKASQSVS  
NDVAWYQQKPGQSPKLLINFAITRYTGVPRFTGSGYGTDFITFTISTVQA  
EDLALYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK (SEC ID N°: 4)

FIG. 1B

**VH A2 murina**

ATGCAATGGAGGATCTTTCTCTFCATCCTGTGAGGAACTGCAGGTGTCCA  
 CTCCCAGGPTCAGCTGCAGCAGTCTAGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGG  
 GTTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGATACACTTTCAGTACTAT  
 GTTATAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGG  
 AGAGATTTATCCTGGAAGTAATAGTATTTATTACAATGAGAAGTTCRAGG  
 GCAGGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAG  
 CTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGCTATTTCTGTGCAATGGG  
 GGGTAACTACGGCTTTGACTATTTGGGGCCAAGGCACCACCTCTCACAGTCT  
 CCTCA (SEC ID N°: 5)

MEWKI PLFILSGTAGVHSQVQLQCSRPELVKPGASVKMSCKASGYTFIDY  
VISWVKQRTGQGLEWIGEIYPGSNSIYYNRFKGRATLTADKSSSTAYMQ  
LSSLTSEDSAVYFCAMGGNYGFDYWGQGTTLTVSS (SEC ID N°: 6)

**VL A2 murina**

ATGGATTTTCAGSTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCEAATCAGTGCCTCAGT  
 CATAATGTCCAGAGGACAAATTTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGT  
 CTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACCTTGACCTGCACTGCCAGCTCAAGT  
 GTAATTTCCAAITACTTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCC  
 CAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAAACCTGGCTTCTGGAGTCCAGCTC  
 SCTTCAGTGGCASTGGGTCTGGGACTCTTACTCTCTCAAAATCAGCAGC  
 ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTC  
 CCGGCTCACSTTCGGTCTGGGACCAGCTGGAGCTGAAA (SEC ID N°: 7)

MDFOVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMSASLGERVTLTCTASSS  
VNSNYLHWYQQKPGESPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSSTSYSLTISS  
MEAEADAATFYCHQYHRSFLTFGAGTKLELK (SEC ID N°: 8)

FIG. 1C

**VH A3 murina**

ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTCTTTGTTGTTTTTTATCAAGGTGT  
 GCATTSTGAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGTGGAGGATTGTTGCAGCCTA  
 AAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATACC  
 TACGCCATGAACCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGT  
 TGCTGECATAAGAASTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATT  
 CAGTGAAGACAGGTTCCACCATCTCCAGAGATGATTACAAAGCATGCTC  
 TATCTGCAAATGAACAACTTGAAAAGTGAAGACACAGCCATGTATT (G/A) CTG  
 TGTGAGACAGTGGGATTACGACGTCAGGGCTATGAACTACTGGGGTCAAG  
 GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEC ID N°: 9)

MLLGLKWVFFVVFYQGVHCEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNT  
YAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKSNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSM  
 YLQMNKLTEDTAMY (C/Y) CVRQWDYDVRAMNYWGQTSVTVSS (SEC ID  
 N°: 10)

**VL A3 murina**

ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGTATAACATGTTGCTGTGGTTGTCTGG  
 TGTTGAAGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCACATATTCATGTCCACAT  
 CAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGAT  
 ACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACT  
 GATTTACTGGGCATCCACCCGGCTCACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAG  
 GCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTCTCACCAATTAGCAATGTCCAGTCT  
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTGAGCAATATAGCAGCTATCCGTACAC  
 GTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEC ID N°: 11)

METHSQVPVMLLWLSGVEGDI VMTQSHI FMSTSVGDRVSITCKASQDVD  
TAVAWYQQKFGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS  
 EDLADYFCQOYSSYPYTFGGGTKLEIK (SEC ID N°: 12)

FIG. 2

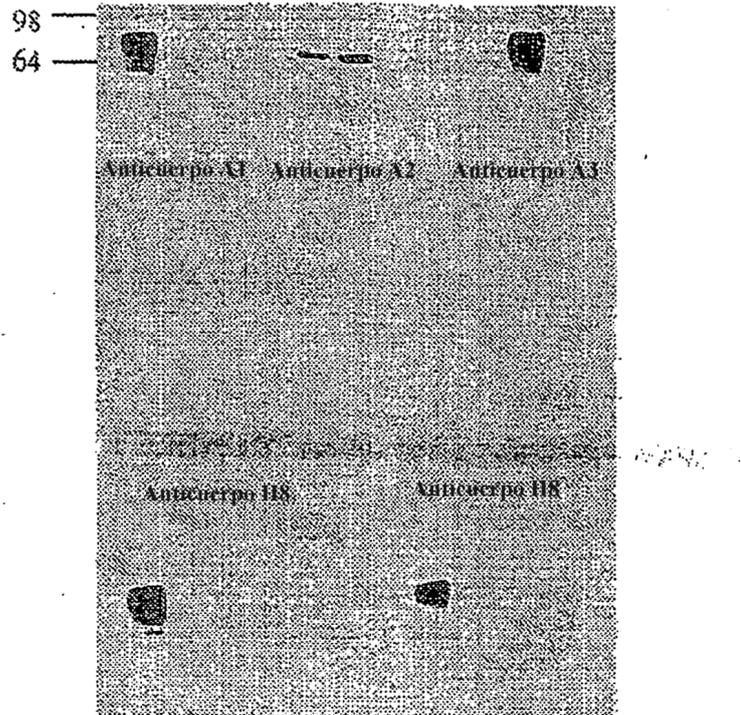


FIG. 3A

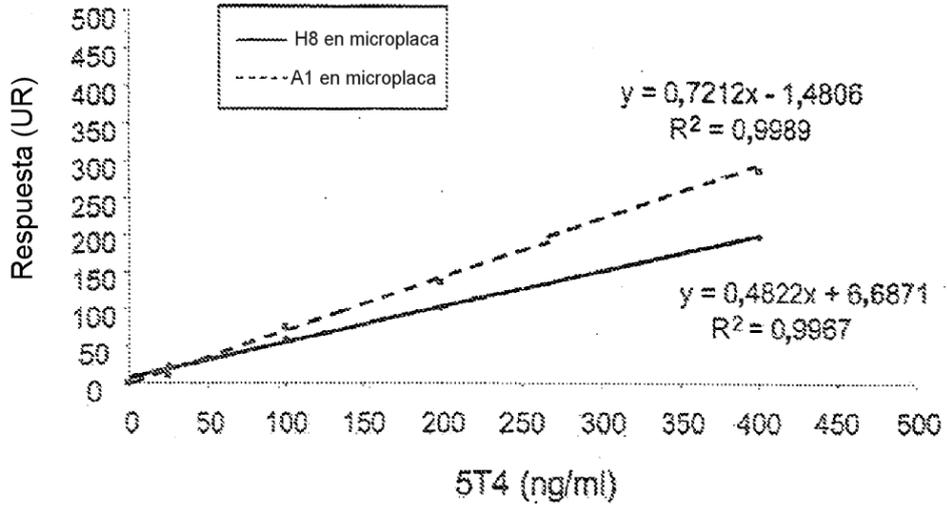


FIG. 3B

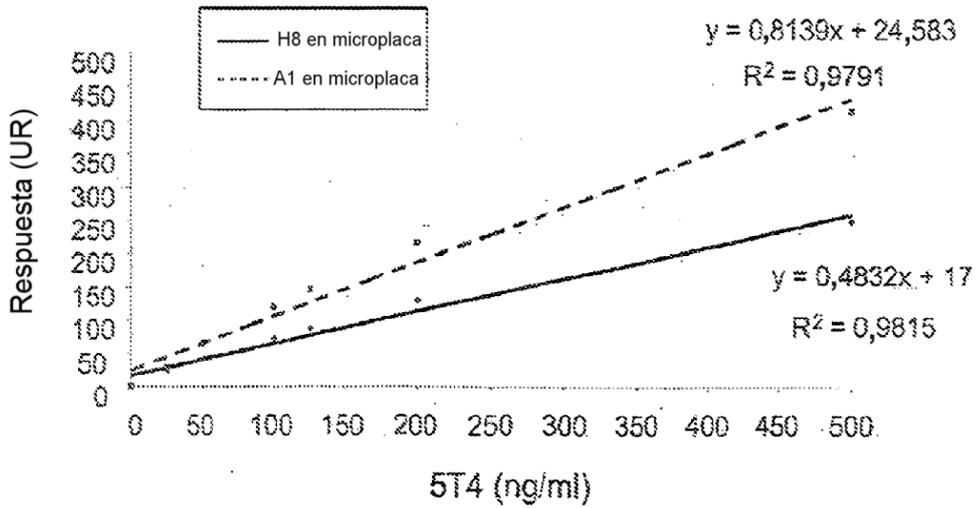


FIG. 4A

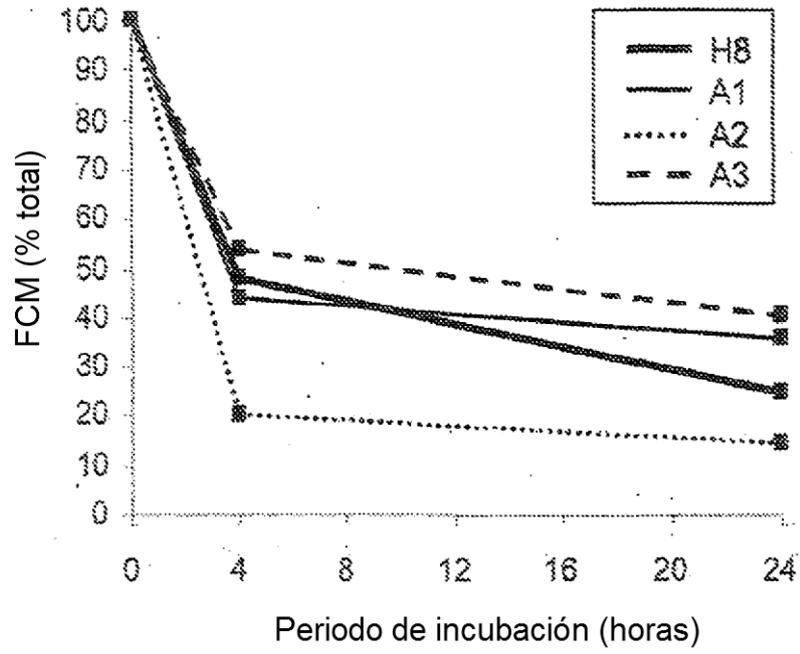


FIG. 4B

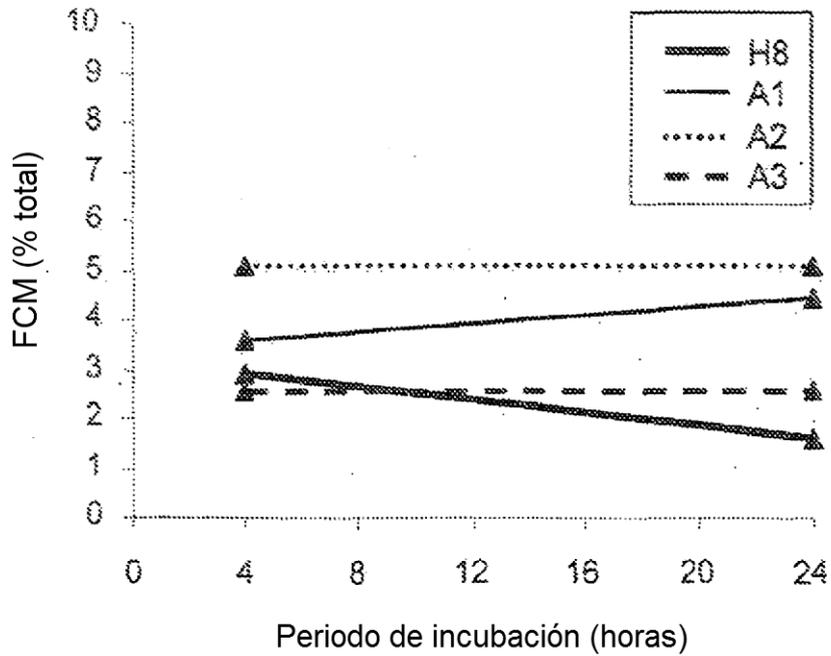


FIG. 4C

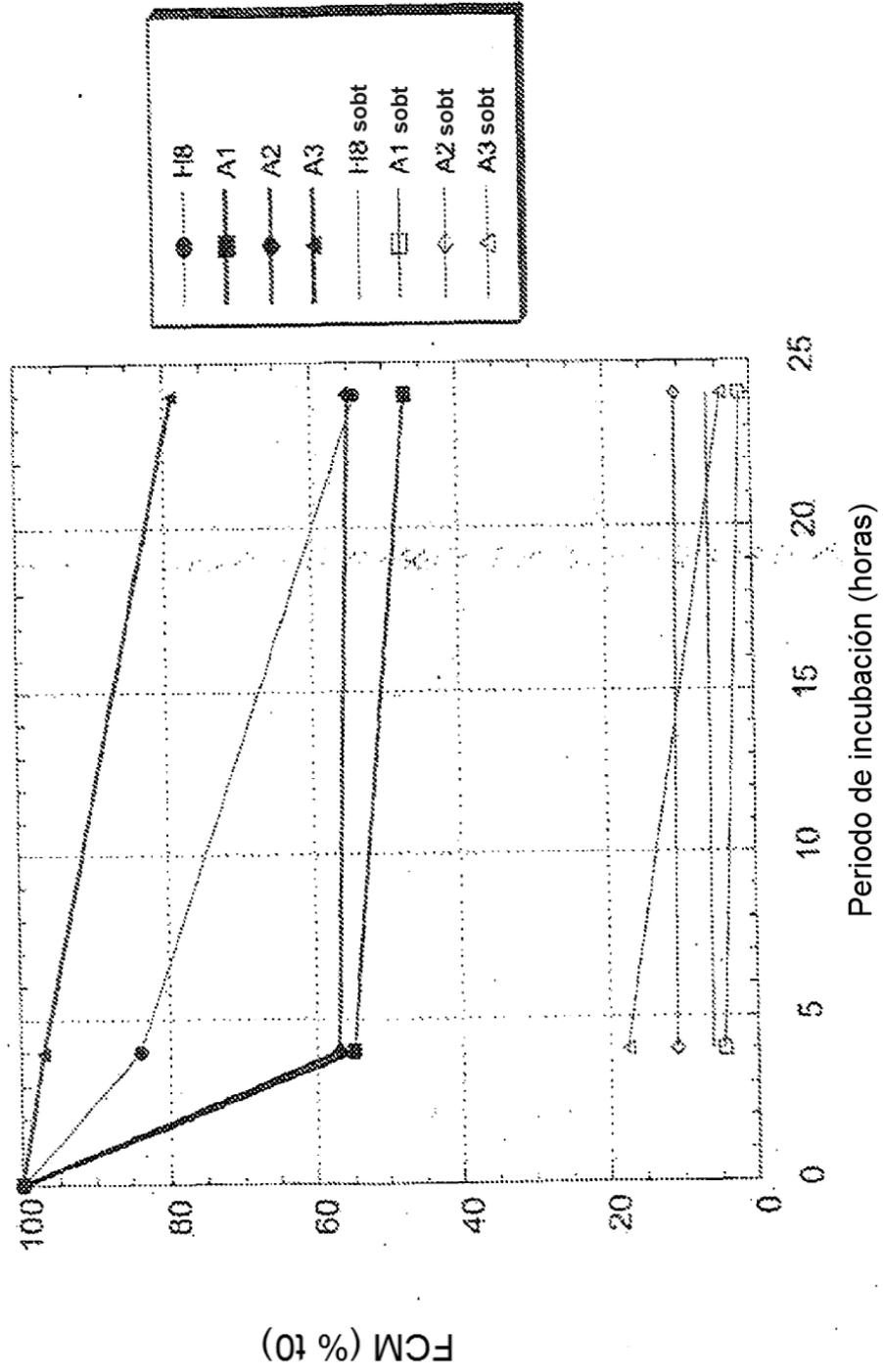


FIG. 5

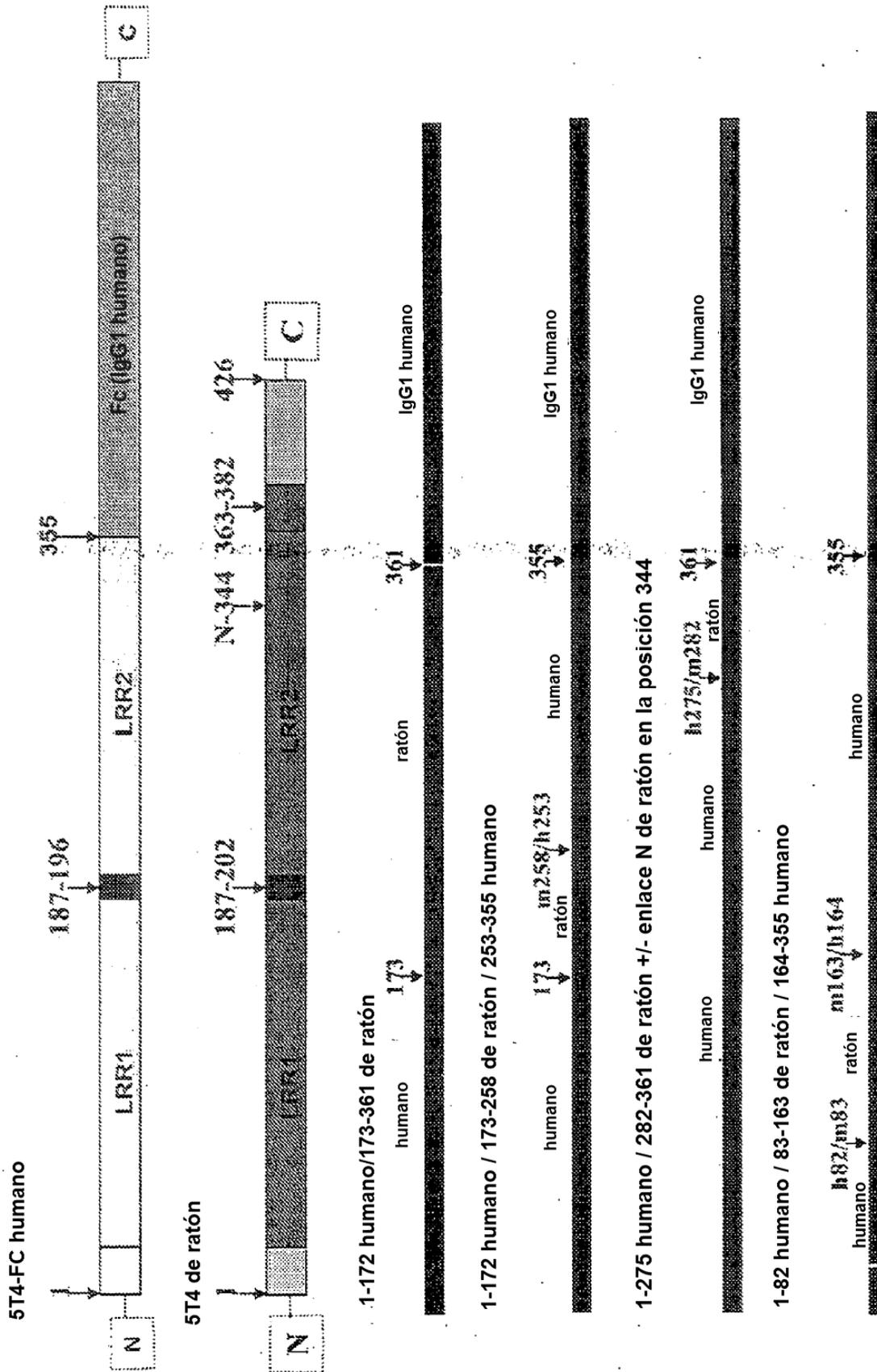


FIG. 6A

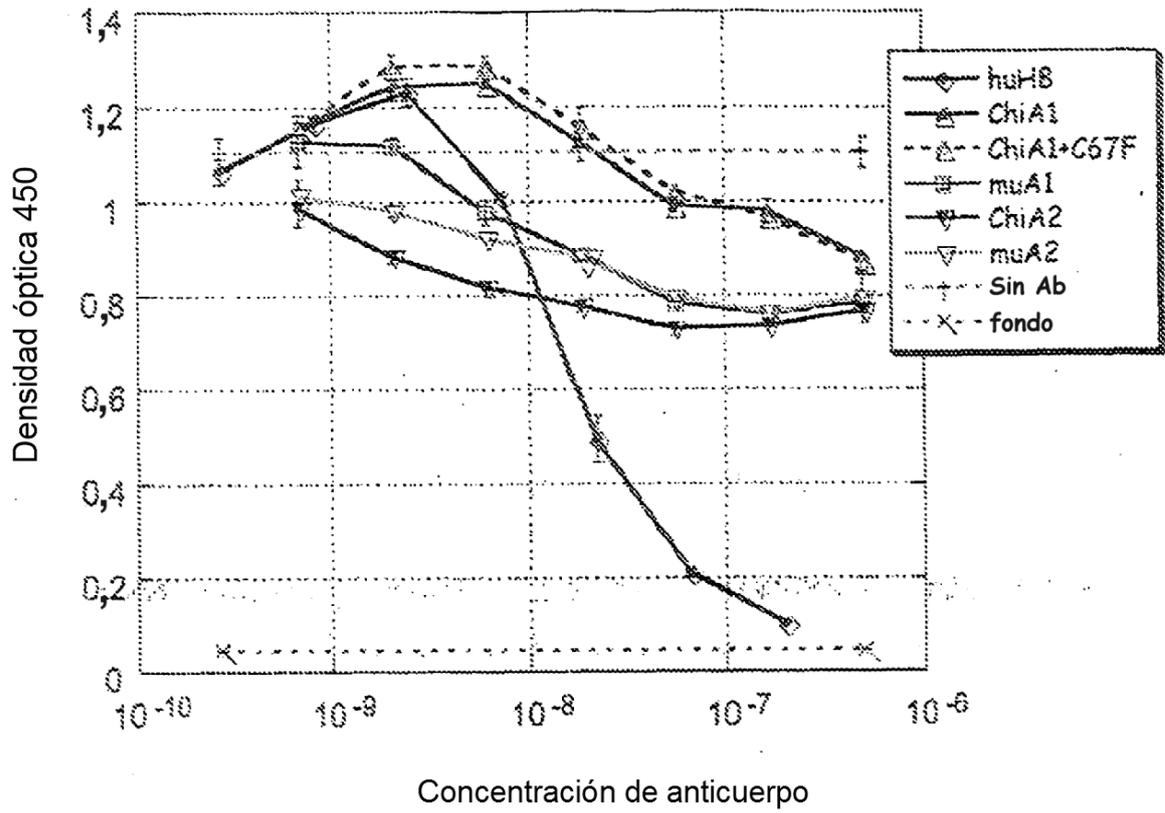


FIG. 6B

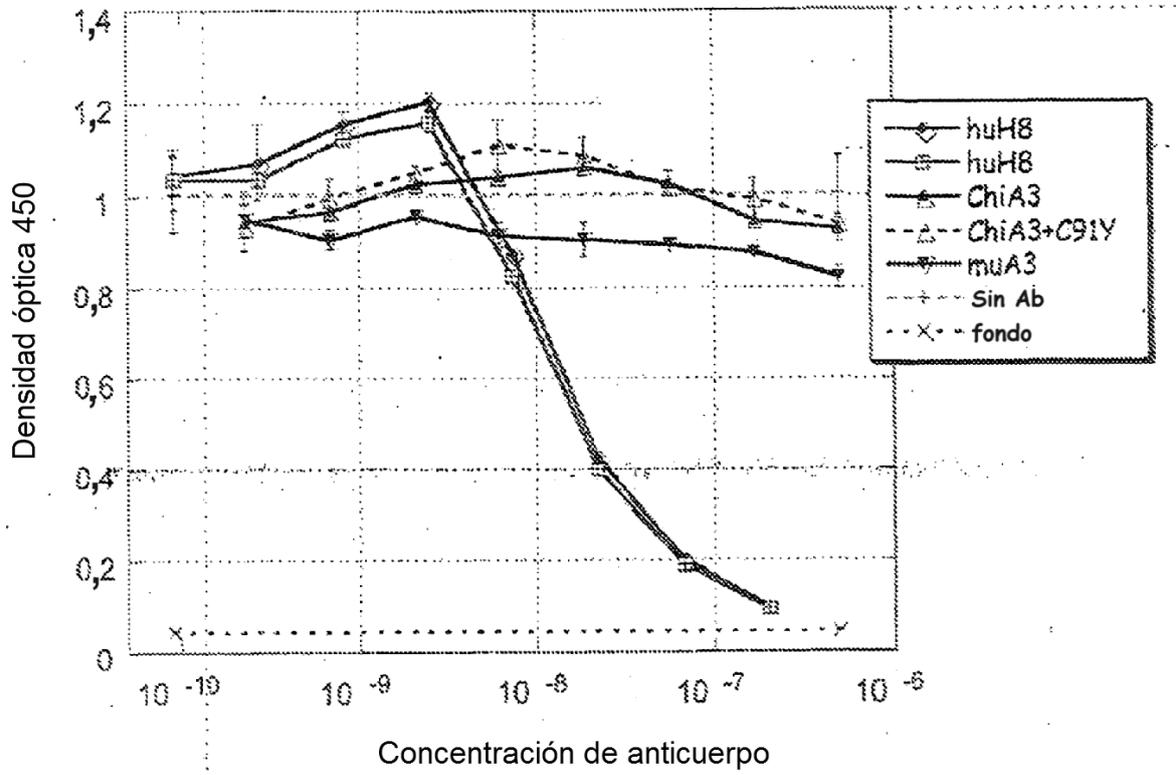


FIG. 7

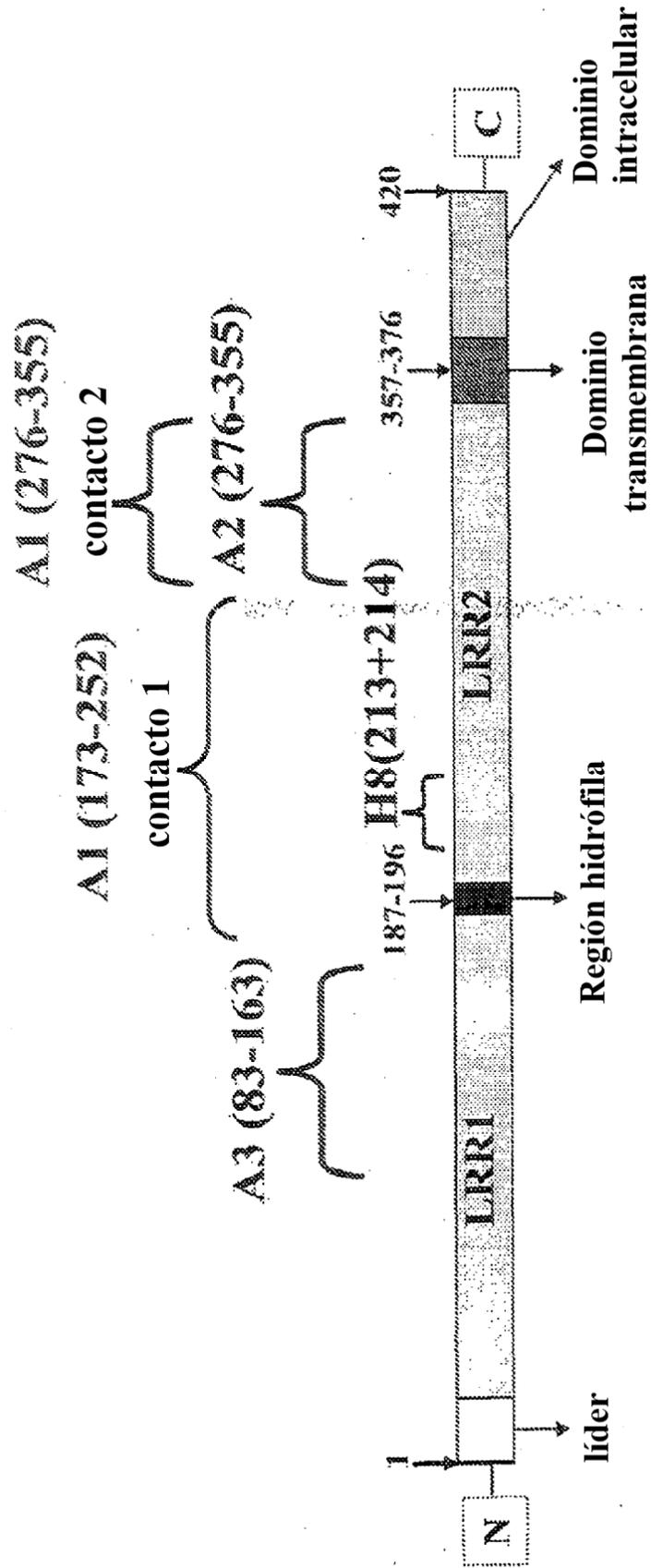
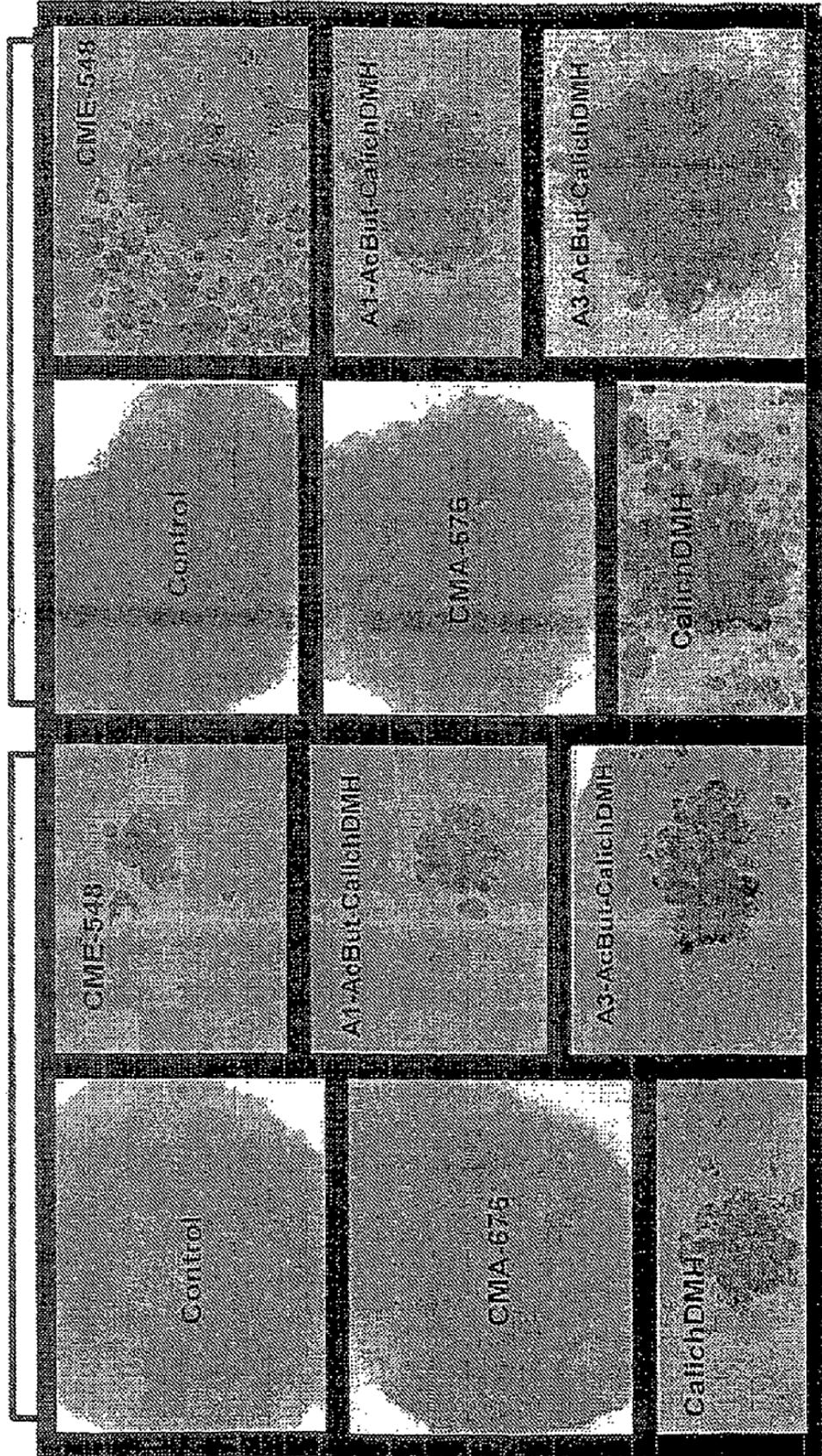


FIG. 8

MDAMB435/neo

MDAMB435/5T4



## FIG. 9A

### ADN de VH A1 humanizada-versión 1.0

CAGGTGCAGCTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG  
 GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAAACTTTGGAATGAACTGGGTGCGA  
 CAGGCCCTGGACAAAGGGCTTAAGTGGATGGGATGGATAAACACCAACACTGGAGAG  
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC  
 AGCACTGCCTATCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTAC  
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCOCTT  
 GTCACAGTCTCCTCA (SEC ID N°: 48)

### Proteína VH A1 humanizada - versión 1.0

QVQLVQSGSEELKKPGASVKVSCKASGYTFTNFGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTNTGE  
FRYAEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGT  
 VTVSS (SEC ID N°: 49)

### ADN de VH A1 humanizada - versión 1.1

CAGGTGCAGCTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG  
 GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAAACTTTGGAATGAACTGGGTGCGA  
 CAGGCCCTGGACAAAGGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATAAACACCAACACTGGAGAG  
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC  
 AGCACTGCCTATCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTAC  
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCOCTT  
 GTCACAGTCTCCTCA (SEC ID N°: 50)

### Proteína VH A1 humanizada - versión 1.1

QVQLVQSGSEELKKPGASVKVSCKASGYTFTNFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGE  
FRYAEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGT  
 VTVSS (SEC ID N°: 51)

### VH A1 humanizada - versión 1.2 (con injertos de CDR en la línea germinal DP-21, subgrupo VH7)

QVQLVQSGSEELKKPGASVKVSCKASGYTFTNFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGE  
FRYAEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGT  
 VTVSS (SEC ID N°: 52)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas K46, C67, S82a y N82a.

## FIG. 9B

### ADN de VH A1 humanizada - versión 2.0

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA  
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATAATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGCGGCTGGAGTGGGTGGCCTGGATAAAACACCAACACCGGTGAG  
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG  
 AACTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTAC  
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT  
 GTCACAGTCTCCTCA (SEC ID N°: 53)

### Proteína VH A1 humanizada - versión 2.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DP-54, subgrupo VH3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNFGMNWVRQAPGKGLEWVAWINTNTGE  
PRYAEEFKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTL  
 VLVSS (SEC ID N°: 54)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas K46, M48, G49, C67, L71, T73, T74, A75, S76 y A78.

### ADN de VH A1 humanizada - versión 2.1

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA  
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATAATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGCGGCTGAACTGGATGGGCTGGATAAAACACCAACACCGGTGAG  
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGATTCACCATCTCCCTGGACAACGCCAAG  
 TCCTCAGCCTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTAC  
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT  
 GTCACAGTCTCCTCA (SEC ID N°: 55)

### Proteína VH A1 humanizada - versión 2.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNFGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTNTGE  
PRYAEEFKGRFTISLDNAKSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTL  
 VLVSS (SEC ID N°: 56)

## FIG. 9C

**ADN de VL A1 humanizada - versión 1.0**

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC  
 ACCATCAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG  
 AAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 57)

**Proteína VL A1 humanizada - versión 1.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DPK24, subgrupo VKIV)**

DI VMTQSPD SLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAVYQOKPGQPPKLLIYFATNRYTG  
 VPDRFSGSGSGEDFTLTISLQAEDVAVYYCQDYSSPWFPGQGTKVEIK (SEC ID  
 N°: 58)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas S43, N49, N60, T63, Y67, F73, L85 y F87.

**ADN de VL A1 humanizada - versión 1.1**

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC  
 ACCATCAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG  
 AAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 59)

**Proteína VL A1 humanizada - versión 1.1**

DI VMTQSPD SLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAVYQOKPGQPPKLLIYFATNRYTG  
 VPDRFSGSGYGTDFLTISLQAEDVAVYYCQDYSSPWFPGQGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 60)

**ADN de VL A1 humanizada - versión 2.0**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGCAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAAACCTGAAGATTTTGGCACTTACTACTGTTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 61)

## FIG. 9D

### Proteína VL A1 humanizada - versión 2.0 (con injertos de CDR en la línea germinal de DPK9, subgrupo VKI)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQOKPKAPKLLIYFATNRYTG  
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQODYSSPWTFGGGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 62)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas V3, Q42, S43, N49, N60, Y67, F73, L85 y F87.

### ADN de VL A1 humanizada - versión 2.1

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGCCAAAGCCCCAAGCTCCTGATCATAATTTGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCOCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 63)

### Proteína VL A1 humanizada - versión 2.1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQOKPKSPKLLIYFATNRYTG  
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQODYSSPWTFGGGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 64)

### ADN de VL A1 humanizada - versión 2.2

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGCCAAAGCCCCAAGCTCCTGATCATAATTTGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCOCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 65)

### Proteína VL A1 humanizada - versión 2.2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQOKPKAPKLLINFATNRYTG  
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQODYSSPWTFGGGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 66)

## FIG. 9E

### ADN de VL A1 humanizada - versión 2.3

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGASTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGCAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCCCAAAACCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 67)

### Proteína VL A1 humanizada - versión 2.3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAVWYQQKPGKAPKLLIYFATNRYTG  
VPNRFGSGSGTDFFTLTISSLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 68)

### ADN de VL A1 humanizada - versión 2.4

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGCAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATACGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 69)

### Proteína VL A1 humanizada - versión 2.4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAVWYQQKPGKAPKLLIYFATNRYTG  
VPSRFGSGSGYGTDFFTLTISSLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 70)

### ADN de VL A1 humanizada - versión 2.5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGCAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA  
 GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTTTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 71)

### Proteína VL A1 humanizada - versión 2.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAVWYQQKPGKAPKLLIYFATNRYTG  
VPSRFGSGSGTDFFTLTISSLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 72)

## FIG. 9F

### ADN de VL A1 humanizada - versión 3.0

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCCCTGTCTCCAGGCGAAAGAGCC  
 ACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG  
 AAACCTGGGCAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTATTTTGC AACCAATCGCTACACTGGC  
 ATCCCAGCCCGCTTCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGSCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 73)

### Proteína VL A1 humanizada - versión 3.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DPK23, subgrupo VKIII)

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSNDAVWYQOKPGQAPRLLIYFATNRYTG  
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 74)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas F10, S43, N49, V58, N60, Y67, F73, L85 y F87.

### ADN de VL A1 humanizada - versión 3.1

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCCCTGTCTCCAGGCGAAAGAGCC  
 ACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG  
 AAACCTGGGCAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTATTTTGC AACCAATCGCTACACTGGC  
 ATCCCAGCCCGCTTCTCCGGCAGCGGCTACGGCACAGACTTCACTCTCACCATCAGC  
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC  
 TGGACCTTCGGTCAGGSCACCAAGGTGGAAATCAA (SEC ID N°: 75)

### Proteína VL A1 humanizada - versión 3.1

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSNDAVWYQOKPGQAPRLLIYFATNRYTG  
 IPARFSGSGYGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 76)

## FIG. 9G

### **VH huA2 versión 1.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DP-75, subgrupo VH1)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYVISWVRQAPGGGLEWNGEITYPGSNS  
IYNEKFKGRVTMTRDTSISITAYMELSRLRSDDTAVYYCARGGNYGFDYWGQGLVT  
 VSS (SEC ID N°: 77)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas K38, R40, T41 I48, I69, T75, Q81, S82b, E85 y M94.

### **VH huA2 versión 2.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DP-54, subgrupo VH3)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYVISWVRQAPGKGLEWVAEITYPGSNS  
IYNEKFKGRFTTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYGFDYWGQGLVT  
 VSS (SEC ID N°: 78)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas K38, R40, T41, I48, G49, A67, A71, K73, S74, S76, A78 y M94.

### **VL huA2 versión 1.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DPK20, subgrupo VKIII)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSVNSNYLHWYQQKPKGLAPRLLIYSTSNLAS  
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 79)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas S43, W47, A60, S70, S77, M78 y A80

### **VL huA2 versión 2.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DPK9, subgrupo VKI)**

DIQMTQSPFSSLSASVGRVITICTASSVNSNYLHWYQQKPKAPKLLIYSTSNLAS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK (SEC  
 ID N°: 80)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas V3, L4, S43, W47, S70 y M78.

## FIG. 9H

### VH huA3 versión 1.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DP-29, subgrupo VH3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKSNY  
YATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARQWDYDVRAMNYWGQ  
 GPLVTVSS (SEC ID N°: 81)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas A49, Q75, S76, M89, C91 y V93.

### VH huA3 Versión 2.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DP-54, subgrupo VH3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSN  
YATYYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQWDYDVRAMNYWGQ  
 GPLVTVSS (SEC ID N°: 82)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas D73, Q75, S76, M89, C91 y V93.

### VL huA3 versión 1.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DPK24, subgrupo VKIV)

DIQMTQSPFDSLAVSLGERATINCKASQDVDTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRLTG  
VPDFRFGSGSGTDFTLTISSIQAELVAVYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK (SEC  
 ID N°: 83)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas S43, D85 y F87

### VL huA3 versión 2.0 (con injertos de CDR en la línea germinal DPK9, subgrupo VKI)

DIQMTQSPFSSLSASVGDRTTITCKASQDVDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRLTG  
VPERFSGSGSGTDFTLTISSIQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK (SEC  
 ID N°: 84)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos podría sustituirse en estas posiciones designadas 3V, Q42, S43, D60, D85 y F87.

FIG. 10A

	FR1	CDR1	FR2	SEC ID N°
VH1 consenso	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT		WVRQAPGQGLEWMG	25-27
locus de VH1				
1-3 1-02	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	G--YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	14
1-3 1-03	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YAMH	WVRQAPGQRLWWMG	15
1-3 1-08	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YDIN	WVRQATGQGLEWMG	16
1-2 1-18	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YGIS	WVRQAPGQGLEWMG	17
1-U 1-24	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKVSQYTLT	E--LEMH	WVRQAPGKGLEWMG	18
1-3 1-45	QMQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGYTFT	Y--RYLH	WVRQAFGQALEWMG	19
1-3 1-46	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	20
1-3 1-58	QMQLVQSGPEVKKPKGTSVKVSCKASGFTFT	S--SAVQ	WVRQARGQRLWIG	21
1-2 1-69	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFS	S--YALS	WVRQAPGQGLEWMG	22
1-2 1-e	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFS	S--YALS	WVRQAPGQGLEWMG	23
1-2 1-f	EVQLVQSGAEVKKPKGATVKISCKVSGYTF	D--YYMH	WVQAPGKGLEWMG	24



## FIG. 10B

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo VH 7

**DP-21 (VH 7) N° de referencia de GenBank CAA43346 (SEC ID N°: 88)**

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMG  
WIN  
TNTGNFTYAQGFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDSTRGYSY  
DFWSGYFYYYMDVWGKGTITVSS

Secuencia de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo VH 3

**DP-54 (VH 3-07) N° de referencia de GenBank AB019440 (SEC ID N°: 89)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANI  
KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

**DP-47 (VH3-23) N° de referencia de GenBank AB019439 (SEC ID N°: 90)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS  
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

**DP-49 (VH3-30) N° de referencia de GenBank. AB019439 (SEC ID N°: 91)**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI  
SYDGENKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

**DP-53 (VH3-74) N° de referencia de GenBank AB019437 (SEC ID N°: 92)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRI  
NSDGSSISYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

**DP-48 (VH3-13) N° de referencia de GenBank AB019440 (SEC ID N°: 93)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQATGKGLEWVSAI  
GTAGDTYYPGSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR

FIG. 11

SEC ID N°

	CDR1		CDR2		CDR3	
29	L16 línea germinal...	EIVMTQS PATLSVSPGE RATLSCRASQ SVSS.NLAWY	QKPKGQAPRL			
30	L2 línea germinal...	EIVMTQS PATLSVSPGE RATLSCRASQ SVSS.NLAWY	QKPKGQAPRL			
31	A27 1. germ VL	EIVLTQS PGTLSLSPGE RATLSCRASQ SVSSYLAWY	QKPKGQAPRL			
32	L6 1. germ VL	EIVLTQS PATLSLSPGE RATLSCRASQ SVSS.YLAWY	QKPKGQAPRL			
33	L10 1. germ VL	EIVMTQS PPTLSLSPGE RVTLSCRASQ SVSSXYLAWY	QKPKGQAPRL			
34	L25 1. germ VL	EIVMTQS PATLSLSPGE RATLSCRASQ SVSSXYLSWY	QKPKGQAPRL			
29	L16 línea germinal	LIXGASTRAT	GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFVAVY	YCOQYNNWPP	TV	
30	L2 línea germinal	LIXGASTRAT	GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFVAVY	YCOQYNNWP	.	
31	A27 1. germ VL	LIXGASSRAT	GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS KLEPEDFVAVY	YCOQYGSPP	.	
32	L6 1. germ VL	LIXDASNRRAT	GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFVAVY	YCOQRSNWP	.	
33	L10 1. germ VL	LIXGASTRAT	SIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFVAVY	YCOQDHNLP	.	
34	L25 1. germ VL	LIXGASTRAT	GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFVAVY	YCOQDYNLP	.	

FIG. 12

SEC ID N°	FR1	CDR1	FR2
35	O12 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISS	YLN WYQQKPGKAPKLLIY
36	O2 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISS	YLN WYQQKPGKAPKLLIY
37	O18 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	QASQISN	YLN WYQQKPGKAPKLLIY
38	O8 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	QASQISN	YLN WYQQKPGKAPKLLIY
39	A20 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISN	YLA WYQQKPGKAPKLLIY
40	L1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISN	YLA WFQQKPGKAPKSLIY
41	L15 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISS	WLA WYQQKPEKAPKSLIY
42	L8 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISS	YLA WYQQKPGKAPKLLIY
43	L12 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISS	WLA WYQQKPGKAPKLLIY
44	L11 ATQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	RASQISS	WLA WYQQKPGKAPKLLIY

FIG. 12-1

SEC ID N°

	CDR2	FR3	CDR3
35	012 AASSLQS		QQSYSTP
36	02 AASSLQS		QQSYSTP
37	018 DASNLET		QQYDNLF
38	08 DASNLET		QQYDNLF
39	A20 AASTLQS		QKNSAP
40	L1 AASSLQS		QQYNSYP
41	L15 AASSLQS		QQYNSYP
42	L8 AASTLQS		QQLNSYP
43	L12 DASSLES		QQYNEYS
44	L11 DASSLES		QQYNEYS
			GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC

## FIG. 13

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo Vk I

**DPK9 (O12, Vk 1) N° de referencia de GenBank. X59315 (SEC ID N°: 94)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL  
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

**O2 (O2, Vk 1) N° de referencia de GenBank X59312 (SEC ID N°: 95)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL  
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

**DPK1 (Vk I, 18) N° de referencia de GenBank M64856 (SEC ID N°: 96)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN  
LETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQQYDNL

**DPK 7 (Vk I, L15) N° de referencia de GenBank K01323 (SEC ID N°: 97)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS  
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP

Secuencia de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo Vk IV

**DPK24 (B3, VklV) N° de referencia de GenBank Z00023 (SEC ID N°: 98)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL  
LIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCQQYYSTP

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo Vk III

**DPK23 (Vk-III, L25) N° de referencia de GenBank X72820 (SEC ID N°: 99)**

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGAST  
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQDYDNL

## FIG. 14

### IgG4 humano\_mutado (mutación de bisagra S241P) (SEC ID N°: 45)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSBSTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYTONVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPFCPAPF  
LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQV  
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSPF  
LYSRLETVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

### IgG1 humano (SEC ID N°: 46)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
SPFLYSKLETVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

### Kappa humano (SEC ID N°: 47)

TVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQSSVTE  
QDSKIDSTYLSLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 15

5T4 de titi de cola negra

MFGGCSRGPAAGNGRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSSSSSAPFLASAVSAQPL  
 LFGQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVFTDLPPYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARV  
 PPLAELAAALNLSGSRLDEVQAGAFEHLP SLRQLDLSHNPLAVLSPPAFSGSNASVSA  
 PSPLVELILNHI VPPEDERNRSFEGMVVAALRAGGALHGLHRLELASNHFLYLPRD  
 VLAQLPSLRHLDL SNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLEHLEDNALKV LHNGTLAELOGLP  
 HVRVFLDNNPWVCDCHMADMVAWLKETEVVQCKYQLTCAFPPEKMRNRV LLELNSADL  
 DCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIG (SEC ID N°: 85)

5T4 de mono Cynomolgous

MFGGCSRGPAAGDGRRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSFSSSAPFLASAASAQPP  
 LPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPEDLPLVVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARR  
 PPLAELAAALNLSGSRLDEVQAGAFEHLP SLRQLDLSHNPLAVLSPPAFSGSNASISA  
 PSPLVELILNHI VPPDDKRQNRSFEGMVAAALVAGRALQGLHLELASNHFLYLPRD  
 VLAQLPSLRHLDL SNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLEHLEDNALKV LHNGTLAELOGLP  
 HVRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKQTEVVQCKDRLTCAFPPEKMRNRV LLELNSADL  
 DCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFFLVLYLNREKGT KKMWHNTRD ACRDHMEGY  
 HYRYEINADPRLTNLSSNSDV (SEC ID N°: 86)