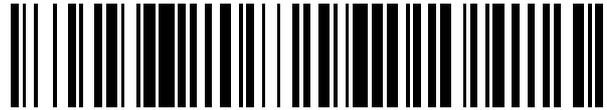


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 229**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2005 E 05754865 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1766017**

54 Título: **Anticuerpo específico de tumor**

30 Prioridad:

10.06.2004 US 578291 P

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

06.05.2015

73 Titular/es:

**VIVENTIA BIO INC. (100.0%)
147 Hamelin Street
Winnipeg, MB R3T 3Z1 , CA**

72 Inventor/es:

**GLOVER, NICHOLAS, RONALD;
MACDONALD, GLEN, CHRISTOPHER;
ENTWISTLE, JOYCELYN;
CIZEAU, JEANNICK;
BOSC, DENIS, GEORGES y
CHAHAL, FRANCINA, C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 229 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo específico de tumor

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a proteínas que se unen a tumores de forma específica, y a todos los usos de las mismas. En particular, la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo específicos de antígenos o moléculas de células cancerosas y a los inmunoconjugados que comprenden las proteínas de unión de la invención, y los métodos de uso de los mismos.

Antecedente de la invención

En el año 2000 se estimó que 22 millones de personas padecían cáncer en todo el mundo, y 6,2 millones de muertes eran atribuibles a este tipo de enfermedades. Cada año aparecen más de 10 millones de nuevos casos y se espera que esta estimación aumente en un 50 % en los próximos 15 años (OMS, World Cancer Report. Bernard W. Stewart y Paul Kleihues, eds. IARC Press, Lyon, 2003). Los tratamientos contra el cáncer actuales se limitan a cirugía invasiva, radioterapia y quimioterapia, que ocasionan, todos ellos, bien efectos secundarios potencialmente graves, toxicidad no específica y/o cambios traumáticos en la imagen del cuerpo y/o la calidad de vida de la persona que lo padece. El cáncer se puede volver resistente a la quimioterapia, reduciendo posibilidades adicionales de tratamiento y la posibilidad de éxito. El pronóstico de algunos cánceres es peor que para otros y en algunos, como el cáncer de pulmón o de páncreas son casi siempre fatales. Además, algunos cánceres con una tasa de éxito de tratamiento relativamente elevada, tal como cáncer de mama, tienen también una tasa de incidencia muy elevada y, por tanto, siguen siendo causa principal de defunción.

Por ejemplo, cada año se producen más de un millón de casos nuevos de cáncer de mama en todo el mundo. Los tratamientos consisten en la extirpación quirúrgica de mínima a radical del tejido mamario y ganglios linfáticos con radioterapia y quimioterapia en el caso de la enfermedad metastásica. El pronóstico de la enfermedad localizada es relativamente bueno, con una tasa de supervivencia a 5 años de aproximadamente el 50 %, pero una vez que el cáncer alcanza la metástasis, es incurable, con una supervivencia promedio de aproximadamente 2 años. A pesar de la mejora en las tasas de éxito de los tratamientos, casi 400.000 mujeres mueren de cáncer de mama cada año, al mayor número de fallecimientos de cáncer entre las mujeres, por encima de los fallecimientos debidos a cáncer de pulmón. Entre las personas supervivientes a corto y medio plazo, la mayoría padecen durante el resto de su vida el traume de un tratamiento quirúrgico invasivo y desfigurador.

Otro ejemplo es el cáncer de hígado, del que aparecen más de medio millón de nuevos casos cada año y casi el mismo número de fallecimientos debido a la poca eficacia del tratamiento. Los carcinomas hepatocelulares representan aproximadamente el 80 % de todos los cánceres de hígado y en muy pocos casos se pueden curar. La tasa de supervivencia a cinco años es solo de aproximadamente el 10 % y la supervivencia después del diagnóstico es frecuentemente inferior a 6 meses. Aunque la extirpación quirúrgica del tejido enfermo puede ser eficaz, no constituye una opción para la mayoría de los casos debido a la presencia de cirrosis hepática. Los carcinomas hepatocelulares son muy resistentes a la radiación y la respuesta a la quimioterapia es mala.

Otro ejemplo más es el del cáncer pancreático, del que aparecen cada año 200.000 casos con muy mal pronóstico. De hecho, la mayoría de los pacientes fallecen en el año posterior al diagnóstico y solo un pequeño porcentaje de pacientes sobrevive cinco años. La cirugía es el único tratamiento disponible, pero está asociado con una elevada tasa de morbilidad y complicaciones ya que implica no solamente la resección de al menos una parte del páncreas, sino también del duodeno, parte del yeyuno, conducto biliar y vesícula biliar, y una gastrectomía distal. En algunos casos, también se extirpan el bazo y los ganglios linfáticos.

El cáncer de vejiga es el noveno cáncer más frecuente en el mundo, y se estima que cada año aparecen 330.000 nuevos casos y 130.000 fallecimientos. En Europa, esta enfermedad es la causa de muerte de aproximadamente 50.000 personas cada año. El tratamiento actual incluye la administración intravesicular de quimioterapia e inmunoterapia con la vacuna del bacilo de Calmette-Guerin (BCG) que implica el riesgo adicional de infección sistémica con la bacteria de la tuberculosis. A pesar de este régimen de tratamiento agresivo, el 70 % de estos tumores papilares superficiales experimentarán recidiva durante una evolución clínica prolongada, y algunos progresarán a carcinomas invasivos. La elevada tasa de recurrencia de esta enfermedad y los ciclos de tratamiento repetido asociados hace que esta forma de cáncer sea una de las más caras de tratar durante la vida del paciente. Para pacientes con enfermedad recurrente, las únicas opciones son experimentar múltiples cirugías de cistoscopia que requieren anestesia o cirugía mayor, radical, que altera la vida (habitualmente una cistectomía). La cistectomía radical consiste en la extirpación de la vejiga, próstata y vesícula seminal en los varones, y de los ovarios, el útero, uretra y parte de la vagina en mujeres.

Existen muchos más ejemplos de cáncer para los que los tratamientos actuales no satisfacen las necesidades de los paciente, bien debido a su falta de eficacia y/o porque tienen elevadas tasas de morbilidad y efectos secundarios graves. Sin embargo, estos datos estadísticos y hechos que se han seleccionado ilustran bien la necesidad de

tratamientos para el cáncer que tengan mejores perfiles de seguridad y eficacia.

Una de las causas de la falta de adecuación de los tratamientos contra el cáncer actuales es su falta de selectividad para los tejidos y células afectadas. La resección quirúrgica siempre implica la extirpación de tejido aparentemente normal como "margen de seguridad" que puede aumentar la morbilidad y el riesgo de complicaciones. También extirpa parte del tejido sano que puede estar entreverado con las células tumorales y que podrían potencialmente mantener o restaurar la función del órgano o tejido afectado. La radiación y la quimioterapia destruirán o dañarán muchas células normales debido a su modo de acción no específico. Esto puede dar como resultado efectos secundarios importantes tales como náuseas graves, pérdida de peso y una energía reducida, pérdida de cabello, etc., así como un aumento en el riesgo de desarrollar un cáncer secundario posteriormente durante la vida. Un tratamiento más selectivo de las células cancerosas dejaría sin daños las células normales y al mismo tiempo mejoraría el resultado, el perfil de efectos secundarios y la calidad de vida.

La selectividad del tratamiento del cáncer se puede mejorar mediante el uso de anticuerpos que son específicos de las moléculas presentes solamente, o principalmente, en las células cancerosas. Dichos anticuerpos se pueden utilizar para modular el sistema inmune y potenciar el reconocimiento y la destrucción del cáncer por el propio sistema inmune del paciente. También pueden bloquear o alterar el funcionamiento de la molécula diana y, por tanto, de las células cancerosas. También se pueden utilizar para dirigir fármacos, genes, toxinas u otras moléculas médicamente relevantes hacia las células cancerosas. Dichos complejos de anticuerpo-fármaco se denominan habitualmente inmunotoxinas o inmunoconjugados, y muchos de estos compuestos se han ensayado en los últimos años [Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11:570-578; Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. *Expert Opin Pharmacother* 1:1117-1129; Wahl RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 73:989-992; Grossbard ML, Fidas P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol Immunopathol* 76:107-114; Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol* 33:287-314; Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 14:115-120; Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 18:195-201; Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345:241-247]. La mayoría de anticuerpos ensayados hasta la fecha se han suscitado contra marcadores conocidos del cáncer en la forma de anticuerpos monoclonales de ratón, a veces "humanizados" mediante ingeniería molecular. Lamentablemente, sus dianas también pueden estar presentes en cantidades significativas en un subconjunto de células normales, aumentando de esta forma los efectos tóxicos no específicos. Además, estos anticuerpos son básicamente proteínas de ratón que el sistema inmunitario del paciente humano considera como proteínas extrañas. La reacción inmune posterior y la respuesta de anticuerpos pueden dar como resultado una pérdida de eficacia o bien efectos secundarios.

Los inventores han utilizado un enfoque diferente en su desarrollo de anticuerpos para el tratamiento del cáncer. En lugar de inmunizar animales experimentales con células cancerosas o marcadores aislados de células cancerosas, se deseaban solamente aquellos marcadores que son reconocidos por el propio sistema inmune del paciente o, en otras palabras, que el sistema inmune considerase una molécula extraña. Esto implica que los marcadores o antígenos están normalmente sustancialmente ausentes de la células normales y, por tanto, se reduce adicionalmente el riesgo de toxicidad no específica. Se generan bibliotecas de hibridoma a partir de linfocitos derivados de pacientes con cáncer y los anticuerpos que secretan se ensayaron para determinar su unión a células normales y tumorales. Solamente los anticuerpos que muestran elevada selectividad para células cancerosas se guardan para su posterior evaluación y desarrollo como agente terapéutico o diagnóstico para el cáncer. Uno de estos anticuerpos muy selectivos es el sujeto de esta solicitud de patente. Además de ser selectivo, este anticuerpo es totalmente compatible con el sistema inmune del paciente por ser una proteína completamente humana. El anticuerpo de la invención se puede utilizar en con fines de diagnóstico o con uso terapéutico o como base para genomanipular otras moléculas de unión para el antígeno diana.

La estructura básica de una molécula de anticuerpo consiste en cuatro cadenas de proteína, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Estas cadenas están conectadas entre sí por enlaces disulfuro. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada. Las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada se pueden subdividir a su vez en regiones marco y regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Cada región variable de cadena ligera y de cadena pesada está compuesta por tres regiones CDR y cuatro regiones marco.

CD44 representa una familia de glicoproteínas de la superficie celular codificada por un único gen que comprende un total de 20 exones. Los exones 19 y 20 se expresan conjuntamente como la cola citoplásmica y por tanto la mayoría de grupos de investigación los agrupan como el "exón 19" (Liao et al. *J. Immunol* 151:6490-99, 1993). El término exón 19 se usará en lo sucesivo para designar los exones genómicos 19 y 20. La diversidad estructural y funcional se consigue mediante cortes y empalme alternativo del ARN mensajero que implica 10 exones "variantes" identificados como los exones 6-15 o, más a menudo, como los "exones variantes" 1-10 (v1-v10). En seres humanos, el exón variante 1 contiene un codón de detención y habitualmente no se expresa. De este modo, el

variante de CD44 con mayor potencial es CD44v2-10 (véase Naor et al. *Adv Cancer Res* 71:241-319, 1997 para una revisión de CD44).

Los exones 1-5 y todos los exones variantes forman parte del dominio extracelular y contienen muchos sitios potenciales para modificaciones posteriores a la traducción. El dominio transmembrana está fuertemente conservado entre especies, pero la cola intracelular se puede truncar, lo que conduce a otro tipo de variante. Una de estas variantes comprende los exones variantes 8-10 pero carece de parte del exón 19. Se ha demostrado que los cambios en el dominio intracelular alteran la función de CD44, en parte con respecto a la unión y la internalización de ácido hialurónico (AH). CD44 no solamente está implicado en la unión a moléculas extracelulares, también tiene propiedades de señalización celular (véase Turley et al. *J Biol Chem* 277(7):4589-4592, 2002 para revisión).

El CD44 "normal" (CD44), la forma expresada más frecuentemente de CD44, contiene los exones 1-5 y 16-19 y ninguno de los exones variantes. El peso molecular de la proteína núcleo es de 37-38 kDa pero la modificación posterior a la traducción puede dar como resultado una molécula de 85-95 kDa o más (Drillenburg et al., *Blood* 95(6):1900, 2000). Se une al ácido hialurónico (AH), un glicosaminoglicano extracelular, de forma constitutiva y CD44 frecuentemente se denomina como receptor AH. Es interesante que la presencia de exones variantes puede reducir la unión entre AH y CD44, de forma que no se puede decir que los variantes de CD44 se unan al AH de forma constitutiva, sino que dicha unión puede ser inducible (revisado en Naor et al. *Adv Cancer Res* 71:241-319, 1997). Véase la Figura 17 para algunos ejemplos de variantes.

CD44E, también llamado CD44v8-10, contiene los exones variantes 8-10 además de los exones 1-5 y 16-19. Otras variantes incluyen CD44v3-10, CD44v6, CD44v7-8 y muchas otras. Los exones variantes forman parte del dominio extracelular de CD44.

CD44E puede estar presente en algunas células epiteliales normales, especialmente mediante célula generativas de las células basales del epitelio espinocelular estratificado y o del epitelio glandular (Mackay et al. *J Cell Biol* 124(1-2):71-82, 1994) y del feto en determinadas etapas del desarrollo. Pero de manera importante, se ha demostrado que se expresa en exceso en varios tipos de células cancerosas. Usando RT-PCR, lida y Bourguignon (*J Cell Physiol* 162(1):127-133, 1995) y Kalish et al. (*Frontiers Bioscience* 4(a):1-8, 1999) han demostrado que CD44E está presente en el tejido mamario normal y es más abundante que las CD44. También han demostrado que CD44, incluyendo CD44E y CD44s se expresan en exceso, y preferentemente se ubican en tejidos metastásicos de cáncer de mama. Miyake et al. (*J Urol* 167(3):1282-87, 2002) informó de que el ARNm de CD44v8-10 se expresa intensamente en el cáncer urotelial e incluso se puede detectar en células urinarias exfoliadas de pacientes con cáncer urotelial invasivo en comparación con el superficial. La relación entre el ARNm de CD44v8-10 y el de CD44v10 aumenta en el cáncer, y se ha demostrado que tiene valor diagnóstico en cáncer de mama, pulmón, laríngeo y de vejiga. La presencia de CD44v8-10 también se ha confirmado mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal (Okamoto et al. *J Natl Cancer Inst* 90(4): 307-15, 1997). CD44v8-10 también se puede expresar en exceso en el cáncer de vesícula biliar (Yamaguchi et al. *Oncol Rep* 7(3):541-4, 2000), carcinoma de células renales (Hara et al. *Urology* 54(3):562-6, 1999), tumores de las células germinales testiculares (Miyake et al. *Am J Pathol* 152(5):1157-60, 1998), carcinoma pulmonar no microcítico (Sasaki et al. *Int J Oncol* 12(3):525-33, 1998), cáncer colorrectal (Yamaguchi et al. *J Clin Oncol* 14(4):1122-27, 1996) y cáncer gástrico (Yamaguchi et al. *Jpn J Cancer Res* 86(12): 1166-71, 1995). También se ha demostrado que la expresión en exceso de CD44v8-10 tiene valor diagnóstico en cáncer de próstata (Martegani et al. *Amer J Pathol* 154(1): 291-300, 1999).

La alfa-fetoproteína (AFP) es una proteína sérica importante sintetizada durante la vida fetal. Su presencia en adultos es habitualmente indicativa de carcinomas, especialmente los de hígado y los teratocarcinomas. Forma parte de la familia del gen albuminoide que también comprende albuminas séricas y alfa y la proteína de unión a vitamina D. AFP comprende 590 aminoácidos para un peso molecular de aproximadamente 69-70 kDa y tiene un sitio de glicosilación. (Morinaga et al., *Proc Natl Acad Sci* 80:4604-08, 1983; Mizejewski *Exp Biol Med* 226(5):377-408, 2002). Las variantes moleculares se han estudiado e identificado en roedores, pero en seres humanos no existen informes de la detección de proteínas variantes. Un informe reciente ha identificado un ARNm variante que, si se expresa, codificaría una proteína de 65 kDa. Se espera que esta proteína permanezca en el citoplasma (Fukusawa et al. *J Soc Gynecol Investig* May 20, publicación electrónica, 2005).

Sumario de la invención

Los presentes inventores han preparados anticuerpos específicos de tumores humanos que se unen a varios tipos de células tumorales entre las que se incluyen las de la vejiga, mama, de ovario, próstata y útero. De forma importante, los anticuerpos no se unen significativamente al tejido normal, convirtiéndolos en candidatos adecuados para tratamiento tumoral. Los inventores han clonado y secuenciado los anticuerpos, y han determinado la secuencia de las regiones variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo y de las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3. Por consiguiente, la invención proporciona una proteína de unión que se une a la interfase 5-v8 de CD44E que comprende las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena ligera, que comprende las secuencias de aminoácidos SGNLGNKYVC (SEC ID N°: 1), EDTKRPS (SEC ID N°: 2) y QAWDSRTEI (SEC ID N°: 3), respectivamente; y las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos GDEYYWS (SEC ID N°: 4),

YMSYRGSSYYSPSLQS (SEC ID N°: 5) y KYCGGDCRSDFI (SEC ID N°: 6), respectivamente.

5 También se describen en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y/o 3 de la cadena ligera, que comprende las secuencias de aminoácidos SGDNLGNKYVC (SEC ID N°: 1), EDTKRPS (SEC ID N°: 2) y QAWDSRTEI (SEC ID N°: 3), respectivamente; y secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y/o 3 de la cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos GDEYYWS (SEC ID N°: 4), YMSYRGSSYYSPSLQS (SEC ID N°: 5) y KYCGGDCRSDFI (SEC ID N°: 6), respectivamente.

10 También se describen en el presente documento regiones variables de la cadena ligera que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y/o 3 de la cadena ligera de la invención (SEC ID Nros: 1-3), y regiones variables de la cadena pesada aisladas que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y/o 3 de la cadena ligera de la invención (SEC ID Nros: 4-6). En una realización, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 7).
 15 En otra realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 2 (SEC ID).

También se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de la cadena ligera de la invención, y una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de la cadena pesada de la invención. En una realización, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 8). En otra realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la Figura 2 (SEC ID N°: 10).

25 También se describen en el presente documento una proteína de unión que se une a la interfase 5-v8 de CD44E, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera de la invención (es decir, una o más de las SEC ID Nros: 1-3) y/o al menos una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada de la invención (es decir, una o más de las SEC ID Nros: 4-6). La invención proporciona una proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende las regiones variables de la cadena ligera de la invención y las regiones variables de
 30 cadena pesada de la invención.

Los inventores han identificado también el antígeno que se une a las proteínas de unión de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona la proteína de unión de la invención que se une a una proteína que comprende la interfase 5-v8 de CD44E.

35 Además, la invención proporciona composiciones que comprenden las proteínas de unión de la invención, tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, con un excipiente farmacéuticamente aceptable, transportador, tampón o estabilizante.

40 Otro aspecto de la presente invención es un inmunoconjugado que comprende (1) proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une a la interfase 5-v8 de CD44E en o en una célula cancerosa, unido a (2) una molécula efectora. Un aspecto adicional de la presente invención es un inmunoconjugado que comprende (1) proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une a la interfase 5-v8 de CD44E que se ha internalizado en una célula cancerosa, unido a (2)
 45 una molécula efectora. En una realización preferida, la molécula efectora es (i) una marca, que puede generar una señal detectable, de forma directa o indirecta, o (ii) un agente terapéutico de cáncer, que puede ser citotóxico, citostático o bien previene o reduce de otra forma la capacidad de las células cancerosas para dividirse y/o experimentar metástasis. Preferentemente, el agente terapéutico de cáncer es una toxina.

50 La invención también proporciona composiciones que comprenden el inmunoconjugado de la invención y usos del inmunoconjugado para tratar o prevenir el cáncer, y para fines diagnósticos.

Un aspecto adicional de la invención es un método para diagnosticar el cáncer en un mamífero que comprende las etapas de:

- 55
- (1) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho mamífero con una proteína de unión de la invención que se une a un antígeno en o de la célula cancerosa en condiciones que permiten la formulación de un complejo proteína de unión-antígeno;
 - (2) medir la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo; y
 - 60 (3) comparar la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo con la de un control.

Otro aspecto de la presente invención es un agente diagnóstico que comprende el inmunoconjugado de la invención, en el que la molécula efectora es una marca, que puede generar una señal detectable, directa o indirectamente.

65 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Deberá entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican

realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración.

Breve descripción de los dibujos

5 La invención se describirá ahora por referencia a los dibujos, en los que:

La Figura 1 es la secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de VB1-008.

10 La Figura 2 es la secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de VB1-008.

La Figura 3 es un aglomerado de células fijadas con SKBR-3 (aumento de 400X) teñidas con VB1-008 (A) y el anticuerpo control de isotipo 4B5 (B). A resaltar la tinción prominente de la membrana (flecha).

La Figura 4 son fotografías representativas de la tinción inmunohistoquímica de testículos normales con VB1-008 y el anticuerpo control de isotipo 4B5. (A) La Muestra 925 analiza tejido (aumento de 400X) teñido con VB1-008.

15 La tinción de la membrana de células de esperma maduro se indica con una flecha. (A) La Muestra 925 analiza tejido (aumento de 400X) teñido con la IgG de control de isotipo 4B5. A resaltar la ausencia de tinción. La flecha indica células de esperma maduro para su contraste con la tinción mediante VB1-008 de (A).

La Figura 5 enseña la Muestra 3427A1 de adenocarcinoma de mama (400X) teñida con VB1-008 y la IgG de control de isotipo 4B5. A resaltar la tinción de la membrana celular de las células tumorales, especialmente de las células en contacto con la matriz extracelular (flecha blanca). Las células cercanas al centro del tumor muestran principalmente tinción citoplasmática (flecha negra). La flecha indica células tumorales no teñidas. Las células tumorales se tiñeron con VB1-008.

20 La Figura 6 enseña la Muestra 946B1 de carcinoma de vejiga (400X) teñida con VB1-008 (A) y la IgG de control de isotipo 4B5 (B). La flecha indica la tinción de membrana de las células tumorales con VB1-008 (A) pero no con el anticuerpo de control (B).

La Figura 7 enseña la Muestra 4036A2 de carcinoma de útero (aumento de 200X) teñida con VB1-008 y la IgG del anticuerpo de control 4B5. A resaltar la tinción de membrana (flecha) con VB1-008 (A y C) pero no con el anticuerpo de control (B). Un aumento mayor del carcinoma de útero (600X) muestra tinción de la membrana (C).

30 La Figura 8 es una demostración de la unión del anticuerpo a la superficie celular tras la incubación de células A-375 a diferentes temperaturas tal como se determina mediante citometría de flujo. El marcado fluorescente de las células A-375 tras la incubación de suspensiones celulares a 4 °C: 4B5 (1) y VB1-008 (2) Mercado fluorescente de células A-375 tras calentar las células unidas a anticuerpo a 37 °C: VB1-008 durante 60 min (3), durante 120 min (4).

35 La Figura 9 muestra una evaluación mediante microscopio confocal de la internalización de VB1-008. Las células A-375 se incubaron con anticuerpo a 4 °C, se lavaron y se calentaron a 37 °C durante 60 min. Las células se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con anticuerpo secundario marcado fluorescente. El marcado fluorescente de las células A-375 tras la incubación de VB1-008 a 4 °C durante 60 min, muestra una distribución superficial perimetral de la marca, amplificación (60X x 4) (A). Tras la incubación de las células unidas a anticuerpo a 37 °C durante 60 min, las células mostraron una intensa tinción intracelular mediante el anticuerpo internalizado, amplificación (60X x 4) (B).

Las Figuras 10A, B y C muestran un análisis western de reacciones de inmunoprecipitación con VB1-008. La Figura 10A muestra los resultados del experimento en condiciones no reductoras, mientras que las Figuras 10B y C muestran los resultados del experimento en condiciones reductoras.

45 Las Figuras 11A y B muestran la presencia de dos manchas diferentes de proteínas en el complejo de antígeno purificado, muy próximo en peso molecular. Probablemente las proteínas no se percibieron como dos banas en 1D-PAGE debido a la apilación de proteínas.

La Figura 11A representa el perfil de transferencia Western del gel bidimensional y la Figura 11B representa la contraparte con tinción de Coomassie.

50 Las Figuras 12A y B muestran la cartografía de los péptidos obtenidos y el recubrimiento de secuencia de la molécula AFP original, nº de acceso G114501989. La Figura 12A muestra la cartografía de los péptidos obtenidos a partir del gel bidimensional. Los aminoácidos resaltados en negrita representan las secuencias de aminoácidos identificadas mediante el análisis EM. Las regiones sombreadas representan la homología de las secuencias de péptidos y por tanto representan gráficamente la cobertura de la secuencia. La Figura 12B muestra la cartografía completa de los péptidos obtenidos a partir del gel monodimensional y bidimensional. Los aminoácidos resaltados en negrita representan las secuencias de aminoácidos según el análisis EM. Las regiones sombreadas representan la homología de las secuencias de péptidos y por tanto detectar la cobertura de la secuencia. Los aminoácidos subrayados no se detectaron.

60 La Figura 13 muestra la inmunopurificación del antígeno VB1-008 usando 1000 µg de membranas MDA-MB-435S como fuente. El antígeno(s) purificado(s) se resolvió en SDS-PAGE en condiciones no reductoras de la muestra. Se evitaron agentes reductores tales como DTT o β-mercaptoetanol para preservar la conformación natural del antígeno o antígenos de unión. La muestra se resolvió en dos bandas del gel. Una banda (A), se tiñó para proteína; la otra (B) se sometió a transferencia western y se sondeó con VB1-008, para garantizar la presencia del antígeno específico. La banda "E" de la porción del gel teñida con coomassie se recortó y envió para análisis EM.

65 La Figura 14 muestra la cartografía completa de los péptidos obtenidos y la cobertura de la secuencia de la

molécula CD44, nº de acceso GI1105583. Los aminoácidos resaltados en rojo representan las secuencias de aminoácidos identificadas mediante el análisis EM. Las regiones sombreadas representan la homología de las secuencias de péptidos y por tanto representan gráficamente la cobertura de la secuencia. Los aminoácidos de la zona subrayada constituyen la región variable (v8-v10) característica de la isoforma 3 o CD44E.

La Figura 15A muestra la reactividad de VB1-008 con la molécula AFP recombinante, comercialmente disponible de RDI systems. La AFP recombinante se sometió a electroforesis, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se sondeó con VB1-008. Los resultados indican claramente la reactividad de VB1-008 con AFP.

Las Figuras 15B y C son perfiles en gel bidimensional de "B" y "C", que fueron inmunoprecipitados obtenidos mediante el uso de VB1-008. Los geles se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon con anti-CD44 y anti-AFP, en ambos casos, anticuerpos monoclonales de ratón.

La Figura 16 es un análisis western en condiciones no reductoras. Se utilizó anti-CD44 para inmunopurificar proteínas CD44 a partir de células MDA-MB-435S y la fracción purificada se sometió a SDS-PAGE y análisis mediante transferencia western en condiciones no reductoras. El experimento se realizó sobre tres conjuntos, y cada conjunto era idéntico a los demás. Cada uno de los conjuntos se sondeó con 5 µg/ml de anti-CD44, anti-AFP y VB1-008. Anti-CD44 y anti-AFP fueron anticuerpos monoclonales de ratón, mientras, VB1-008 es un anticuerpo monoclonal humano de VBI.

La Figura 17 es una representación esquemática de la distribución de diferentes exones en el gen CD44 de seres humanos. El corte y empalme alternativo de la región variable da como resultado la creación de numerosas isoformas, unas pocas de las isoformas notificadas se han representado esquemáticamente en la figura correspondiente.

La Figura 18A representa gráficamente la secuencia de aminoácidos de CD44E. La parte resaltada representa el tramo de 17 aminoácidos utilizado para generar los péptidos 1-3. El péptido de control negativo se resalta en la región del extremo C de la proteína. La Figura 18B muestra los resultados de un experimento de unión de VB1-008 a los péptidos 1-3.

La Figura 19A muestra los resultados de un estudio de competición usando los péptidos 1-3 frente a la unión de VB1-008. La Figura 19B muestra los resultados de un estudio de competición usando los péptidos 1-3 frente a un anticuerpo de control (anti-EGFR).

La Figura 20 muestra la secuencia de nucleótidos del inmoconjugado VB6-008 (SEC ID N°: 11). La secuencia de la secuencia líder de PeIB está en minúscula, con el codón de inicio en negrita. Los códigos de detención están en mayúsculas y en negrita.

La Figura 21 muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera del inmoconjugado VB6-0008 (SEC ID N°: 12 y 13).

La Figura 22 muestra la construcción VB6-008 completa.

La Figura 23 muestra la unidad VB6-008 nº 1, que incluye el PeIB-VH-CH-Furin-De-Bouganin.

La Figura 24 muestra la unidad VB6-008 nº 2 que consiste en PeIB-VL-CL.

La Figura 25 muestra los resultados de un experimento de citotoxicidad in vitro usando VB6-008.

La Figura 26 es una representación gráfica del casete gamma.

La Figura 27 es una representación gráfica del ensamblaje de la inmunotoxina Fab-bouganina.

Descripción detallada de la invención

(A) Definiciones

El término "administrado sistémicamente" tal como se usa en el presente documento significa que el inmoconjugado y/o otros terapéuticos se pueden administrar de forma sistémica de una forma cómoda tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc.), administración oral, inhalación, administración transdérmica o aplicación tópica (tal como mediante una crema o pomada tópica, etc.), aplicaciones de supositorio, o mediante un implante. Un implante puede ser un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, como membranas sialásticas, o fibras. Los supositorios contienen por lo general principios activos en el intervalo de 0,5 % a 10 % en peso.

Se pretende que el término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluya anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede proceder de fuentes recombinantes y/o producirse en animales transgénicos. Se pretende que el término "fragmento de anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluya Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, y multímeros de los mismos y fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales. Por ejemplo, Los fragmentos F(ab')₂ se puede generar por tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento resultante F(ab')₂ se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpo biespecíficos y otros fragmentos también se pueden sintetizar por técnicas recombinantes.

El término "anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención" tal como se usa en el presente documento comprende las secuencias CDR de la cadena ligera (SEC ID Nros: 1-3) y las secuencias CDR de la cadena pesada (SEC ID Nros: 4-6) de forma que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a la célula tumoral sin unirse sustancialmente a células normales. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención también incluyen

anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen a una proteína que comprende la interfase 5-v8 de CD44E.

Por "condiciones de hibridación al menos moderadamente rigurosas" se entiende que se seleccionan condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en solución. La hibridación se puede producir en todo o en una parte de la molécula de ácido nucleico. La parte que hibrida tiene típicamente al menos 15 (por ejemplo 20, 25, 30, 40 o 50) nucleótidos de longitud. Los expertos en la materia reconocerán que la estabilidad de un duplete de ácido nucleico, o los híbridos, se determina por la T_m , que en los tampones que contienen sodio es función de la concentración de ion sodio y de la temperatura ($T_m = 81.5 \text{ }^\circ\text{C} - 16.6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%(\text{G}^+\text{C}) - 600/\text{l})$, o una ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros de las condiciones de lavado que determinan la estabilidad del híbrido son la concentración de ion sodio y la temperatura. Para identificar moléculas que sean similares, pero no idénticas, respecto a una molécula de ácido nucleico conocida se puede asumir que un emparejamiento incorrecto del 1 % da como resultado una disminución en la T_m de aproximadamente $1 \text{ }^\circ\text{C}$, por ejemplo, si se desean moléculas de ácido nucleico que tengan una identidad $>95 \%$, la temperatura final de lavado se reducirá en aproximadamente $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Basándose en estas consideraciones, los expertos en la materia podrán seleccionar fácilmente las condiciones de hibridación adecuadas. En realizaciones preferidas, se seleccionan condiciones de hibridación rigurosas. A modo de ejemplo, se pueden utilizar las siguientes condiciones para conseguir una hibridación rigurosa: hibridación a 5x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC)/5x solución de Denhardt/1,0 % SDS a $T_m - 5 \text{ }^\circ\text{C}$ basándose en la ecuación anterior, seguido por un lavado de 0,2x SSC/0,1 % SDS a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Las condiciones de hibridación moderadamente rigurosas incluyen una etapa de lavado en 3x SSC a $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Se entiende, sin embargo, que se pueden lograr rigores equivalentes con otros tampones, sales y temperaturas. Se pueden encontrar directrices adicionales relativas a las condiciones de hibridación en: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6 y en: Sambrook y col., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol. 3.

El término "proteína de unión" tal como se usa en el presente documento se refiere a proteínas que se unen específicamente a otra sustancia. En una realización, proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

El término "proteínas de unión de la invención" tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención.

Por "forma biológicamente compatible adecuada para su administración *in vivo*" se entiende una forma de la sustancia a administrar en la que cualquier efecto tóxico está ampliamente superado por los beneficios terapéuticos.

El término "cáncer" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier cáncer que se pueda unir a una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

El término "CD44" tal como se usa en el presente documento se refiere a la familia de las moléculas CD44 que están codificadas por un único gen que comprende un total de 19 exones. Existen 10 exones variables. El corte y empalme alternativo de las regiones variables da como resultado la creación de numerosas variantes diferentes de CD44 (Véase la Figura 17). El término "CD44E", también conocido como CD44v8-10, se refiere a la variante epitelial de CD44. CD44E contiene los exones variantes 8-10 además de los exones 1-5 y 16-19. El término "exón v8 de CD44" se refiere al exón variable 8 de CD44. El término "interfase 5-v8 de CD44E" se refiere a la región en la que el exón 5 se conecta con el exón variable 8 de CD44E. Se trata de una secuencia continua que incluye parte de la región del exón 5 y parte del exón variable 8 de CD44E.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa", tal como se usa en el presente documento, es una en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido sin eliminar las propiedades deseadas de la proteína.

El término "sistema de liberación controlada" tal como se usa significa que el inmunoc conjugado y/u otro terapéutico de cáncer de la invención se puede administrar de una forma controlada. Por ejemplo, una microbomba puede suministrar dosis controladas directamente en la zona del tumor, regulando por tanto de forma precisa la temporalización y la concentración de la composición farmacéutica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138).

El término "administración directa" tal como se usa en el presente documento significa que el inmunoc conjugado y/u otro terapéutico de cáncer se puede administrar, sin limitación, por vía intratumoral, por vía intravascular, y por vía peritumoral. Por ejemplo, el inmunoc conjugado se puede administrar mediante una o más inyecciones directas al tumor, mediante perfusión continua o discontinua al interior del tumor, por introducción de un depósito del inmunoc conjugado, por introducción de un aparato de liberación lenta dentro del tumor, por introducción de una formulación de liberación lenta dentro del tumor, y/o mediante aplicación directa sobre el tumor. Mediante el modo de administración "al interior del tumor," se incluye la introducción del inmunoc conjugado y/u otro terapéutico de cáncer en el área del tumor, o en el interior de un vaso sanguíneo o vaso linfático de forma que sustancialmente fluye directamente a la zona del tumor.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. Las cantidades eficaces de un inmunocombinado pueden variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, peso del animal. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas se pueden administrar diariamente, o la dosis se puede reducir proporcionalmente tal como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

La expresión "regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada" tal como se usa en el presente documento se refiere a las regiones de hipervariabilidad en el interior de la región variable de la cadena pesada de una molécula de anticuerpo. La región variable de la cadena pesada tiene tres regiones determinantes de la complementariedad denominadas región determinante de la complementariedad 1 de la cadena pesada, región determinante de la complementariedad 2 de la cadena pesada y región determinante de la complementariedad 3 de la cadena pesada, desde el extremo amino al extremo carboxi.

El término "región variable de la cadena pesada" tal como se usa en el presente documento se refiere a la región variable de una cadena pesada.

El término "inmunocombinado de la invención" tal como se usa en el presente documento comprende (1) una proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de la invención unida a (2) una molécula efectora. La molécula efectora puede ser cualquier molécula que se desee suministrar a la célula cancerosa, incluyendo, pero sin limitarse a (i) una marca, que puede generar una señal detectable, de forma directa o indirecta, o (ii) un agente terapéutico de cáncer, tal como una toxina que sea bien un citotóxico, citostático o bien previene o reduce de otra forma la capacidad de las células cancerosas para dividirse y/o experimentar metástasis.

El término "secuencias de ácido nucleico aislado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico prácticamente exento de material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos, u otros productos químicos cuando se sintetiza por vía química. Un ácido nucleico aislado está también prácticamente exento de secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, las secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) a partir del que se deriva el ácido nucleico. Se pretende que el término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN y puede ser tanto monocatenario como bicatenario.

El término "proteínas aisladas", tales como las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena ligera, regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena pesada, regiones variables de la cadena ligera, regiones variables de la cadena pesada, y proteínas de unión de la invención, se refiere a una proteína prácticamente exenta de material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetizan químicamente.

La expresión "región determinante de la complementariedad de la cadena ligera" tal como se usa en el presente documento se refiere a las regiones de hipervariabilidad en el interior de la región variable de la cadena ligera de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de la cadena ligera tienen tres regiones determinantes de la complementariedad denominadas región determinante de la complementariedad 1 de la cadena ligera, región determinante de la complementariedad 2 de la cadena ligera y región determinante de la complementariedad 3 de la cadena ligera, desde el extremo amino al extremo carboxi.

El término "región variable de la cadena ligera" tal como se usa en el presente documento se refiere a la región variable de una cadena ligera.

El término "bouganina modificada" tal como se usa en el presente documento significa una bouganina modificada que tiene una propensión reducida a activar una respuesta inmune como se describe en los documentos WO 2005/090579 y US 2005/0238642.

En un ejemplo, la bouganina modificada tiene la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 17).

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRVFLDKVPTVAT
SKLFPVGNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKLIFSIEAIH
GKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVL
NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQISPD
MGILKFKSSK.**

El término "secuencia de ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósidos o nucleótidos que consiste en bases y azúcares naturales, y uniones entre azúcares (estructura principal). El término también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros no naturales o partes de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser

5 secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases naturales entre las que se encuentran adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden incluir bases modificadas. Los ejemplos de dichas bases modificadas incluyen aza y deaza adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina.

10 El término "identidad de secuencia" tal como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos. Para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos, las secuencias de aminoácidos de ambas secuencias se alinean, preferentemente usando el algoritmo Clustal W (Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, Nucleic Acids Res. 22 (22): 4673-4680), junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff S. y Henikoff J.G., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919)

15 y una penalización por creación de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,1, de forma que el emparejamiento de mayor orden se obtiene entre dos secuencias cuando al menos un 50 % de la longitud total de una de las secuencias está implicada en el alineamiento. Otros métodos que se pueden usar para alinear secuencias son el método de alineamiento de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48: 443), revisado por Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482) de forma que el emparejamiento de mayor orden se obtiene

20 entre ambas secuencias, y el número de aminoácidos idénticos se determina entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se conocen de forma general en la materia e incluyen, por ejemplo, los descritos por Carillo y Lipton (SIAM J. Applied Math., 1988, 48:1073) y los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, Nueva York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects. En general, para este tipo de cálculos se emplearán programas informáticos.

25 Los programas informáticos que se pueden usar con este fin incluyen, pero sin limitación, GCG (Devereux et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12: 387) BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., J. Molec. Biol., 1990: 215: 403).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "tratamiento del cáncer" se refiere a la inhibición de la replicación de células cancerosas, inhibición de la diseminación del cáncer (metástasis), inhibición del crecimiento tumoral, reducción del número de células cancerosas o el crecimiento tumoral, disminución en el grado de malignidad de un cáncer (por ejemplo, aumento de la diferenciación), o mejora de los síntomas relacionados con el

30 cáncer.

El término "variante" tal como se usa en el presente documento incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la presente invención que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas o las moléculas de ácido nucleico de la invención prácticamente de la misma forma. Por ejemplo, las variantes de las proteínas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones de aminoácidos conservativas. Las variantes de las proteínas de la invención también incluyen adiciones y deleciones en las

35 proteínas de la invención.

El término "variante de alfa-fetoproteína" incluye las variantes de la alfa fetoproteína, tal como una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N^o: 14, 15 o 16; o una proteína que sea una versión truncada de la alfa-fetoproteína y tenga el peso molecular de 48-54 kDa y un punto isoeléctrico entre 5,1-5,4.

45 **(B) Proteínas y ácidos nucleicos de la invención**

(i) Regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera y pesada y regiones variables de la cadena ligera y pesada.

50 También se describe en el presente documento una región determinante de la complementariedad 1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SGDNLGNKYVC (SEC ID N^o: 1). También se describe en el presente documento una región determinante de la complementariedad 2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos EDTKRPS (SEC ID). También se describe en el presente documento una región determinante de la complementariedad 3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos

55 QAWDSRTEI (SEC ID N^o: 3).

También se describe en el presente documento una región determinante de la complementariedad 1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GDEYYWS (SEC ID N^o: 4). También se describe en el presente documento una región determinante de la complementariedad 2 de la cadena pesada que comprende la

60 secuencia de aminoácidos YMSYRGSSYYSPSLQS (SEC ID). También se describe en el presente documento una región determinante de la complementariedad 3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos KYCGGDCRSGLDI (SEC ID N^o: 6).

También se describen en el presente documento regiones variables de la cadena ligera que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y/o 3 de la cadena ligera de la invención (SEC ID Nros: 1-3); y regiones variables de la cadena pesada que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2

65

y/o 3 de la cadena ligera de la invención (SEC ID Nros: 4-6). La región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 7), y la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 2 (SEC ID N°: 9).

5 También se describen en el presente documento variantes de regiones variables aisladas de la cadena ligera y regiones variables de la cadena pesada que se unen al mismo epítipo o antígeno reconocido por las regiones variables aisladas de la cadena ligera las regiones variables aisladas de la cadena pesada descritas anteriormente. También se describen en el presente documento variantes de las secuencias de aminoácidos de la SEC ID Nros: 1-6, 7 y 9, incluyendo equivalentes químicos de las secuencias descritas en el presente documento. Dichos equivalentes incluyen proteínas que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas específicas descritas en el presente documento prácticamente de la misma forma. Una variante funcional de una secuencia CDR podrá unirse al antígeno o epítipo reconocido por la secuencia CDR natural. Por ejemplo, los equivalentes incluyen, sin limitación, sustituciones de aminoácidos conservativas.

15 Las secuencias variantes de los aminoácidos de los de las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena ligera, y las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena pesada tienen al menos un 50 %, de forma preferente al menos 60 %, de forma más preferente al menos un 70 %, de la forma más preferente al menos un 80 %, e incluso más preferente al menos un 90 % de identidad de secuencia con las SEC ID Nros: 1-6, respectivamente.

20 Las secuencias variantes de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la cadena pesada tienen al menos un 50 %, de forma preferente al menos 60 %, de forma más preferente al menos un 70 %, de la forma más preferente al menos un 80 %, e incluso más preferente al menos un 90 % de identidad de secuencia con las SEC ID Nros: 7 y 9, respectivamente.

25 También se describe en el presente documento una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de la cadena ligera de la invención, y una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de la cadena pesada de la invención. La región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 8). La región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la Figura 2 (SEC ID N°: 10). También se describen en el presente documento variantes de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la región variable de la cadena ligera y región variable de la cadena pesada. Por ejemplo, las variantes incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de la invención al menos bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas.

35 También se describen en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y/o 3 de la cadena ligera, que comprende las secuencias de aminoácidos SGDNLGNKYVC (SEC ID), EDTKRPS (SEC ID N°: 2) y QAWDSRTEI (SEC ID), respectivamente; y secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y/o 3 de la cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos GDEYYWS (SEC ID), YMSYRGSSYYPSLQS (SEC ID N°: 5) y KYCGGDCRSGLDI (SEC ID), respectivamente. También se describen en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican variantes de las secuencias CDR anteriormente descritas. Las secuencias de ácido nucleico que codifican variantes de las secuencias CDR incluyen las secuencias de ácido nucleico que se hibridan con las secuencias CDR que codifican las secuencias de aminoácido mostradas en las SEC ID Nros: 1-6 al menos bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas.

(ii) Proteínas de unión

50 También se describen en el presente documento una proteína de unión que se une a la interfase 5-v8 de CD44E, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (es decir, una o más de las SEC ID Nros: 1-3) y/o al menos una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (es decir, una o más de las SEC ID Nros: 4-6). Un aspecto de la invención es una proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena ligera, que comprende las secuencias de aminoácidos SGDNLGNKYVC (SEC ID), EDTKRPS (SEC ID N°: 2) y QAWDSRTEI (SEC ID), respectivamente; y las regiones determinantes de la complementariedad 1, 2 y 3 de la cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos GDEYYWS (SEC ID), YMSYRGSSYYPSLQS (SEC ID N°: 5) y KYCGGDCRSGLDI (SEC ID), respectivamente. También se describe en el presente documento una proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la región variable de la cadena ligera de la invención y la región variable de cadena pesada de la invención.

60 Como se afirma anteriormente, los inventores han identificado el antígeno que se une a las proteínas de unión de la invención. En particular, los inventores han demostrado que las proteínas de unión de la invención se unen a la interfase 5-v8 de CD44E.

65

Es importante reconocer que las moléculas CD44 tienen un elevado potencial de N- y O-glicosilación y para la adición de sulfato de condroitina y sulfato de heparán. Sin embargo, el modelo de estas modificaciones post-traduccionales es variable, y parece ser específico de la célula y puede afectar potencialmente la capacidad de CD44 para unirse a HA o a otras moléculas extracelulares. El modelo variable de modificaciones post-traduccionales es especialmente relevante para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD44 ya que se ha demostrado que la unión del anticuerpo se ve afectada por la presencia de tales modificaciones, a pesar de que la estructura principal de la molécula es la misma que la del antígeno utilizado para suscitar el anticuerpo (Matzki et al. *Cancer Res* 63:8278-83, 2003; Martegani et al. *Amer J Pathol* 154(1): 291-300, 1999). Esto también limita la utilidad del CD44 recombinante como inmunógeno ya que su modelo de glicosilación diferiría del de las células tumorales. Las proteínas de unión de la invención son, por lo tanto, especialmente únicas ya que reconocen una forma de CD44 que está presente en células tumorales humanas.

Por consiguiente, la invención proporciona una proteína de unión de la invención que se une a una proteína que comprende la interfase 5-v8 de CD44E.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende todo o parte de una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD. Preferentemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante IgG1 de la cadena pesada. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender todo o parte de una región constante kappa de la cadena ligera o una región constante lambda de una cadena ligera. Preferentemente, la región constante de la cadena ligera es una región constante lambda de la cadena pesada.

Para producir anticuerpos monoclonales derivados de seres humanos, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recoger de un ser humano que padece cáncer y fusionarse con células de mieloma mediante procedimientos normalizados de fusión de células somáticas para inmortalizar dichas células y producir células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia, (por ejemplo, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)) así como otras técnicas como la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., *Immunol. Today* 4:72 (1983)), la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Methods Enzymol*, 121:140-67 (1986)), y el cribado de bibliotecas combinatorias de anticuerpos (Huse et al., *Science* 246:1275 (1989)). Otro ejemplo para fabricar anticuerpos monoclonales humanos se describe en el documento WO/9947929. En otro ejemplo, se puede usar un ligando de tipo mieloma, tal como se describe en Dan y col., (*J Neurosurgery* 76:660-69, 1992). Las células de hibridoma se pueden cribar de forma inmunoquímica para producir anticuerpos específicamente reactivos con células cancerosas, y los anticuerpos monoclonales se pueden aislar.

Los anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpo, reactivos contra antígenos o moléculas concretos, tales como los antígenos o moléculas de una célula cancerosa, también se pueden generar por cribado de bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o partes de los mismos, expresados en bacterias con componentes de la superficie celular. Por ejemplo, fragmentos Fab completos, regiones VH y regiones FV se pueden expresar en bacterias usando bibliotecas de expresión en fagos (véase por ejemplo Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); y McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)).

La presente invención describe también anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen al mismo antígeno que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. Una persona experta en la materia apreciará que se pueden usar ensayos de unión para descubrir otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con las mismas especificidades de unión que los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención. Como se ilustra, a continuación, se puede usar un ensayo de unión de competición para descubrir tales anticuerpos adicionales.

Antes de realizar un ensayo de competición mediante citometría de flujo, se determina la concentración mínima de anticuerpo de la invención de la invención (Ab1) que proporciona la máxima unión contra un número fijo de células tumorales (por ejemplo, células A-375 para VB1-008). Se recogieron un total de 10^6 células a partir de cultivos en crecimiento exponencial y se incubaron con varias concentraciones de anticuerpo durante 1 h a 4 °C. Las células se lavaron y se incubaron con un anticuerpo de detección adecuado durante otra hora más a 4 °C. Tras el lavado, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada anticuerpo de ensayo, se generó una curva de saturación a partir de los datos representando gráficamente el promedio de fluorescencia frente a la concentración del anticuerpo.

Para el ensayo de competición, las células tumorales se prepararon como anteriormente y se trataron por duplicado con una concentración fija de anticuerpo (Ab1). La concentración fija es la concentración mínima de anticuerpo que genera una unión máxima contra un número fijo de células tumorales, tal como se ha determinado anteriormente. Inmediatamente después de la adición del Ab1, se añadieron concentraciones variables del anticuerpo potencialmente inhibidor (Ab2) a cada tubo, y la mezcla se incubó durante 1 h a 4 °C. Tanto el porcentaje de inhibición con el cambio respecto a la fluorescente máxima promedio se calcularon mediante sustracción de la fluorescencia del fondo (PBS-5 % FCS) de la lectura promedio de la fluorescencia de cada muestra de ensayo (Ab1 + Ab2). A continuación, el resultado se divide por la fluorescencia promedio de Ab1 en solitario (unión máxima) menos el fondo (véase a continuación). El resultado del porcentaje de inhibición se obtiene multiplicando por 100. El

promedio de las réplicas junto con su respectivo error estándar se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo. Se utiliza la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de inhibición:

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{Bgd}) / (MF_{Ab1} - MF_{Bgd})] \times 100$$

donde **PI** = porcentaje de inhibición; **MF_(Ab1+Ab2)** = fluorescencia media medida para la mezcla de Ab1+Ab2; y **MF_{Bgd}** = fluorescencia media del fondo con PBS-5 % FCS.

Por consiguiente, la presente solicitud describe una proteína de unión que puede unirse a un antígeno de una célula tumoral en la que la proteína de unión se puede identificar por un método que comprende:

- (1) incubar un número fijo de células tumorales con una concentración mínima de una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (Ab1) que genera una unión máxima contra el número fijo de células tumorales y medir la fluorescencia media de Ab1 (MF_{Ab1});
- (2) ensayar dos o más concentraciones de una proteína de unión de ensayo (Ab2) por adición de Ab2 al Ab1 y a las células tumorales, y medir la fluorescencia media (MF_(Ab1+Ab2));
- (3) medir la fluorescencia media del fondo (MF_{Bgd});
- (4) calcular PI, en la que

$$PI = [(MF_{(Ab1+Ab2)} - MF_{Bgd}) / (MF_{Ab1} - MF_{Bgd})] \times 100;$$

y

- (5) comparar el PI con un valor control de PI; en el que, un PI que tiene una diferencia estadísticamente significativa a partir del control de PI indica que la proteína de unión de ensayo puede unirse al antígeno de la célula tumoral.

El ensay de unión de competición también se puede realizar con péptidos, preferentemente el péptido definido mediante la SEC ID N°: 28. De forma similar al método anteriormente descrito, antes de realizar el ensayo de competición, se determina la concentración mínima de la proteína de unión de ensayo (Ab2) que proporciona una unión máxima contra un número fijo de células tumorales.

Por consiguiente, la presente solicitud también describe una proteína de unión que puede unirse a un antígeno de una célula tumoral en la que la proteína de unión se puede identificar por un método que comprende:

- (1) incubar un número fijo de células tumorales con una concentración mínima de proteína de unión de ensayo (Ab2) que genera la unión máxima contra el número fijo de células tumorales y medir la fluorescencia media de Ab2 (MF_{Ab2});
 - (2) preparar una mezcla de péptido y Ab2 incubando un exceso molar de un péptido definido mediante la SEC ID N°: 28 con dicha concentración mínima de la proteína de unión de ensayo (Ab2);
 - (3) añadir dicha mezcla de células tumorales y medir la fluorescencia media (MF_(Ab2+péptido)); (4) medir la fluorescencia media del fondo (MF_{Bgd});
 - (5) calcular PI, en la que
- $$PI = [(MF_{(Ab2+péptido)} - MF_{Bgd}) / (MF_{Ab2} - MF_{Bgd})] \times 100; \text{ y}$$
- (6) comparar el PI con un valor control de PI;

en el que, un PI que tiene una diferencia estadísticamente significativa a partir del control de PI indica que la proteína de unión de ensayo puede unirse al antígeno de la célula tumoral.

Una persona experta en la materia apreciará que las técnicas de maduración por afinidad se podrían utilizar para modificar las proteínas de unión o los inmunoconjugados de la invención bien aumentando su afinidad por CD44E o seleccionando la unión con la interfase 5-v8 de CD44E.

Se utilizan de forma rutinaria dos estrategias para potenciar la afinidad de unión de un anticuerpo. Un enfoque utiliza la resolución de la estructura cristalina del complejo Ab-Ag para identificar los restos clave implicados en la unión con el antígeno (Davies D.R., Cohen G.H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 7-12). Posteriormente, estos restos se pueden mutar para potenciar la interacción. El otro enfoque imita la estimulación *in vivo* del antígeno que impulsa la maduración por afinidad de la inmunoglobulina producida por los linfocitos B. Durante la maduración de la respuesta inmune, las regiones variables de las inmunoglobulinas se someten a mutaciones somáticas (Mc Heyzer-Williams M. 2003. B-cell signaling mechanism and activation. Fundamental Immunology, Quinta edición, 195-225). Este proceso, muy específico del sistema inmunitario, se caracteriza por la introducción de mutaciones puntuales a una tasa muy alta. Solo se produce en los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables y excluye los dominios conservados. Los linfocitos B que expresan el anticuerpo variante mutado somáticamente se someten a continuación a una selección mediada por el antígeno que da como resultado la selección de una inmunoglobulina de mayor afinidad. Para replicar este fenómeno *in vitro*, se

han utilizado varios enfoques para introducir mutaciones mediante procesos tanto aleatorios como dirigidos. Las mutaciones se pueden introducir mediante PCR propensa a errores, reordenamiento de cadena o cepas *E. coli* impulsoras de mutaciones (Clackson T., Hoogenboom N.R., Griffiths A.D. y Winter G. 1991 Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628, Hawkins R.E., Russell S.J. y Winter G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226, 889-896, Low N., Holliger P. y Winter G. 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368). Esta estrategia conduce a la creación de grandes bibliotecas en las que se seleccionen los clones reactivos mediante una tecnología de expresión tal como mediante ribosoma, fago o levadura (Min L. (2000). Applications of display technology in protein analysis. *Nat. Biotechnol.* 18, 1251-1256).

Las mutaciones dirigidas de las CDR, especialmente CDR3 de las cadenas ligera y pesada, han demostrado ser una técnica eficaz para aumentar la afinidad del anticuerpo. Bloques de 3 a 4 aminoácidos de la CDR3 o de regiones específicas denominadas "puntos calientes" son diana de la mutagénesis. Yang et al. informaron de un aumento de 420 veces de un fragmento Fab gp 120 dirigido contra el VIH mediante la mutación de cuatro restos CDR (Yang W.P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A.T., Burton D.R. y Barbas C.F. III. 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into picomolar range. *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403). Una mutación en la CDR3 de VL combinada con tres mutaciones en la CDR3 de VH de C6.5 scFv proporcionó un aumento de 1230 veces en la afinidad (Schier R., McCall A., Adams G.P., Marshall K.W., Merrit H., Yin M., Crawford R.S. Weiner L.M., Marks C. y Marks J.D. 1996. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementary determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.*, 263, 551-567).

"Puntos calientes" son las secuencias en las que se producen hipermutaciones somáticas *in vivo* (Neuberger M.S y Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 248-254). Las secuencias de los puntos calientes se pueden definir como secuencias de nucleótidos de consenso en determinados codones. La secuencia de consenso es el tetranucleótido, RGYW, en la que R puede ser A o G, Y puede ser C o T y W puede ser A o T (Neuberger M.S y Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 248-254). Además, los restos serina codificados por los nucleótidos AGY están predominantemente presentes en las regiones CDR del dominio variable, comparado con los codificados mediante TCN que corresponde a posibles secuencias de puntos calientes (Wagner S.D., Milstein C. y Neuberger M.S. 1995. Codon bias targets mutation. *Nature*, 376, 732). El análisis estructural ha demostrado que los bucles CDR representan la contribución máxima a la unión con el antígeno, especialmente los bucles CDR3 (Giudicelli V., Chaume D. y Lefranc M.P. 2004. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res.* 32, 435-440). Por tanto, la secuencia de nucleótidos de las CDR de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo de la invención se somete a un barrido para determinar la presencia de las secuencias de puntos calientes y de los codones AGY. Los puntos calientes identificados de las regiones CDR de la cadena ligera y pesada se comparan con las secuencias germinales de las cadenas pesada y ligera mediante el uso de la base de datos International ImMunoGen Tics (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies D.R., Padlan E.A. y Sheriff S. 1990. Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 439-473). Una secuencia idéntica a la línea germinal, sugiere que no se ha producido una mutación somática; por tanto, las mutaciones aleatorias se introducen imitando los eventos somáticos que se producen *in vivo*. Por el contrario, una secuencia diferente demuestra que ya se ha producido alguna mutación somática. Quedará por determinar si la mutación somática *in vivo* era óptima. Los puntos calientes que codifican aminoácidos enterrados o conservados en las CDR no se someten a mutagénesis. Estos restos suelen ser fundamentales para la estructura global, y es improbable que interactúen con el antígeno, ya que están enterrados. Además, las secuencias se pueden comparar en las localizaciones previstas en las secuencias de la línea germinal donde se producen predominantemente mutaciones somáticas (Tomlinson I.M., Cox J.P.L., Gherardi E., Lesk A.M. y Chotia C. 1995. The structural repertoire of the human V domain. *EMBO J.* 14, 4628-4638, Tomlinson I.M., Walter G., Jones P.T., Dear P.H., Sonnhammer E.L.L. y Winter G. 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256, 813-817). Se aplicó una estrategia similar para la maduración por afinidad de BL22 scFv. Una mutación puntual introducida en la CDR3 de la cadena pesada dio como resultado un aumento de 5 a 10 veces en la actividad de unión de varias líneas celulares positivas para CD22 (Salvatore G., Beers R., Margulies I., Kreitman R.J. y Pastan I. 2002. Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. *Clinical Cancer research*, 8, 995-1002). Asimismo, la mutación de varios aminoácidos en los bucles CDR1 y CDR2 también produjo un mutante con mayor afinidad comprendida de 3 tres veces a 7 veces (Ho M., Kreitman J., Onda M. y Pastan I. 2005. In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *J. Biol. Chem.*, 280, 607-617).

Una vez introducidas las mutaciones mediante procesos tanto aleatorios como dirigidos, los anticuerpos se expresan y se evalúan para determinar su función. Por ejemplo, el cribado funcional se puede basar en la unión. Una vez se ha evaluado la función, entonces se puede llevar a cabo la secuenciación del ADN de los anticuerpos seleccionados usando métodos conocidos.

En otra realización, el método de expresión periplásmica anclada (APEX) descrito por Harvey, B et al (PNAS 22 de junio de 2004; 101(25): 9193-8) se utiliza para la maduración por afinidad de las proteínas de unión o los inmunoconjugados de la invención.

Por consiguiente, la invención incluye proteínas de unión de la invención que se han madurado por afinidad para aumentar la afinidad de la proteína de unión a CD44E o para seleccionar una proteína de unión que tiene afinidad para CD44E.

- 5 La invención también proporciona composiciones que comprenden las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, con un excipiente farmacéuticamente aceptable, transportador, tampón o estabilizante.

(C) Inmunoconjugados

- 10 La invención también incluye un inmunoconjugado que comprende (1) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se ha unido a (2) una molécula efectora.

15 El antígeno es una proteína que comprende la interfase 5-v8 de CD44E.

En una realización preferida, la molécula efectora es (i) una marca, que puede generar una señal detectable, directa o indirectamente, o (ii) un agente terapéutico de cáncer, que puede ser citotóxico, citostático o bien previene o reduce de otra forma la capacidad de las células cancerosas para dividirse y/o experimentar metástasis. Dicho inmunoconjugado se puede denominar de una forma general como "el inmunoconjugado de la invención" en el presente documento.

20 En la realización de la invención, la molécula efectora es un agente terapéutico de cáncer. El agente terapéutico de cáncer es preferentemente una toxina que es bien un citotóxico, citostático o bien previene o reduce de otra forma la capacidad de las células cancerosas para dividirse y/o experimentar metástasis. Por consiguiente, un aspecto de la invención es un inmunoconjugado que comprende (1) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, unido a (2) un agente terapéutico de cáncer, tal como una toxina.

25 En otra realización, el inmunoconjugado se internaliza y el agente terapéutico de cáncer es una toxina que bloquea la síntesis de proteínas de la célula, conduciendo por tanto a la muerte celular. De forma importante, puesto que la mayoría de células normales no expresan ampliamente el antígeno presente en las células cancerosas, no se pueden unir ni internalizar el inmunoconjugado, y quedan protegidas del efecto destructivo de la toxina o de otros agentes terapéuticos del cáncer.

30 Se puede utilizar una variedad de moléculas efectoras en los inmunoconjugados de la invención y numerosas de estas moléculas efectoras son moléculas activas intracelularmente. Por consiguiente, en una realización de la invención, el inmunoconjugado se internaliza por la célula cancerosa.

35 En realizaciones preferidas, la molécula efectora es un agente terapéutico de cáncer, más preferentemente una toxina que comprende un polipéptido que tiene actividad inactivante del ribosoma, sin limitación, gelonina, bouganina, saporina, ricina, cadena de ricina A, briodina, toxina diférica, restrictocina, exotoxina A de Pseudomonas y variantes de las mismas. Cuando la proteína es una proteína inactivante del ribosoma, el inmunoconjugado se debe internalizar después de su unión con la célula cancerosa para que la toxina sea citotóxica para las células. Por consiguiente, en una realización de la invención, la molécula efectora es una toxina y el inmunoconjugado se internaliza por la célula cancerosa.

40 En una realización de la invención, la toxina es bouganina o la exotoxina A de Pseudomonas, y sus variantes. En otra realización, la toxina es bouganina modificada o una forma troncada de la exotoxina A de Pseudomonas que consiste en los aminoácidos 252-608.

45 La invención incluye un inmunoconjugado que comprende una proteína codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 11 (Figura 20). La invención incluye también un inmunoconjugado que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 12 y 13 (Figura 21).

50 En otras realizaciones no limitantes, el agente terapéutico de cáncer comprende un agente que actúa para perturbar el ADN. Por tanto, los agentes terapéuticos de cáncer se pueden seleccionar, sin limitación, entre enediinas (por ejemplo, caliqueamicina y esperamicina) y agentes de moléculas pequeñas no de enediina (por ejemplo, bleomicina, metidiopropil-EDTA-Fe(II)). Otros agentes terapéuticos del cáncer útiles de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, daunorubicina, doxorubicina, distamicina A, cisplatino, mitomicina C, ecteinascidina, duocarmicina/CC-1065, y bleomicina/pepleomicina.

55 En otras realizaciones no limitantes, el agente terapéutico de cáncer comprende un agente que actúa para perturbar la tubulina. Dichos agentes pueden comprender, sin limitación, rizoxina/maitansina, paclitaxel, vincristina y vinblastina, colchicina, auristatina dolastatina 10 MMAE, y pelorusida A.

60 En otras realizaciones no limitantes, la parte de agente terapéutico de cáncer de un inmunoconjugado de la invención puede comprender un agente alquilante incluyendo, sin limitación, Asaley NSC 167780, AZQ NSC

182986, BCNU NSC 409962, Busulfano NSC 750, carboxifalatoplatino NSC 271674, CBDCA NSC 241240, CCNU NSC 79037, CHIP NSC 256927, clorambucilo NSC 3088, clorozotocina NSC 178248, cis-platino NSC 119875, clomesona NSC 338947, cianomorflinodoxorubicina NSC 357704, ciclodisona NSC 348948, dianhidrogalactitol NSC 132313, fluorodopano NSC 73754, hepsulfamo NSC 329680, hicantona NSC 142982, melfalano NSC 8806, metil
 5 CCNU NSC 95441, mitomicina C NSC 26980, mitozolamida NSC 353451, mostaza de nitrógeno NSC 762, PCNU NSC 95466, piperazina NSC 344007, piperazinadiona NSC 135758, pipobromano NSC 25154, porfiromicina NSC 56410, mostaza de espirohiantoína NSC 172112, teroxirona NSC 296934, tetraplatino NSC 363812, tio-tepa NSC 6396, trietilenmelamina NSC 9706, mostaza de nitrógeno uracilo NSC 34462, y Yoshi-864 NSC 102627.

10 En otras realizaciones no limitantes, la parte de agente terapéutico de cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un agente antimetabólico incluyendo, sin limitación, alocolchicina NSC 406042, Halicondrina B NSC 609395, colchicina NSC 757, derivado de colchicina NSC 33410, dolastatina 10 NSC 376128 (NG - derivado de auristatina), maitansina NSC 153858, rizoxina NSC 332598, taxol NSC 125973, derivado de taxol NSC 608832, tiocolchicina NSC 361792, tritil cisteína NSC 83265, sulfato de vinblastina NSC 49842, y sulfato de vincristina NSC
 15 67574.

En otras realizaciones no limitantes, la parte de agente terapéutico de cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un inhibidor de la topoisomerasa I incluyendo, sin limitación, camptotecina NSC 94600, camptotecina, sal Na NSC 100880, aminocamptotecina NSC 603071, derivado de camptotecina NSC 95382, derivado de camptotecina NSC 107124, derivado de camptotecina NSC 643833, derivado de camptotecina NSC 629971, derivado de camptotecina NSC 295500, derivado de camptotecina NSC 249910, derivado de camptotecina NSC 606985, derivado de camptotecina NSC 374028, derivado de camptotecina NSC 176323, derivado de camptotecina NSC 295501, derivado de camptotecina NSC 606172, derivado de camptotecina NSC 606173, derivado de camptotecina NSC 610458, derivado de camptotecina NSC 618939, derivado de camptotecina NSC
 20 610457, derivado de camptotecina NSC 610459, derivado de camptotecina NSC 606499, derivado de camptotecina NSC 610456, derivado de camptotecina NSC 364830, derivado de camptotecina NSC 606497, y morfolinodoxorubicina NSC 354646.

En otras realizaciones no limitantes, la parte de agente terapéutico de cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un inhibidor de la topoisomerasa II incluyendo, sin limitación, doxorubicina NSC 123127, amonafida NSC 308847, m-AMSA NSC 249992, derivado de antrapirazol NSC 355644, pirazoloacridina NSC 366140, bisantreno HCl NSC 337766, daunorrubicina NSC 82151, desoxidoxorubicina NSC 267469, mitoxantrona NSC 301739, menogaril NSC 269148, N,N-dibencil daunomicina NSC 268242, oxantrazol NSC 349174, rubidazona NSC 164011, VM-26 NSC 122819, y VP-16 NSC 141540.
 30

En otras realizaciones no limitantes, la parte de agente terapéutico de cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un antimetabolito del ADN o el ARN, sin limitación, L-alanosina NSC 153353, 5-azacitidina NSC 102816, 5-fluorouracilo NSC 19893, acivicina NSC 163501, derivado de aminopterina NSC 132483, derivado de aminopterina NSC 184692, derivado de aminopterina NSC 134033, un antifol NSC 633713, un antifol NSC 623017, antifol soluble de Baker NSC 139105, dicloralil lausona NSC 126771, brequinar NSC 368390, ftorafur (profármaco) NSC 148958, 5,6-dihidro-5-azacitidina NSC 264880, metitratato NSC 740, derivado de metitratato NSC 174121, N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA) NSC 224131, pirazofurina NSC 143095, trimetrexato NSC 352122, 3-HP NSC 95678, 2'-desoxi-5-fluorouridina NSC 27640, 5-HP NSC 107392, alfa-TGDR NSC 71851, glicinato de aficolina NSC 303812, ara-C NSC 63878, 5-aza-2'-desoxicetidina NSC 127716, beta-TGDR NSC 71261, ciclocitidina NSC 145668, guanazol NSC 1895, hidroxiaurea NSC 32065, inosina glicodialdehído NSC 118994, macbecina II NSC 330500, pirazoloimidazol NSC 51143, tioguanina NSC 752, y tiopurina NSC 755.
 40
 45

La presente invención proporciona además inmunocomplejos que comprenden (i) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, unida a (2) una molécula efectora, en el que la molécula efectora es una marca, que puede generar una señal detectable, indirecta o directamente. Estos inmunoconjugados se pueden utilizar en aplicaciones de investigación o diagnóstico, tal como para la detección del cáncer *in vivo*. Preferentemente, la marca puede producir, de forma tanto directa como indirecta, una señal detectable. Por ejemplo, la marca puede ser radiopaca o un radioisótopo, tales como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente de formación de imágenes; o un ion metálico.
 50
 55

En otra realización, el inmunoconjugado se detecta indirectamente. Por ejemplo, un anticuerpo secundario que es específico del inmunoconjugado y que incluye una marca detectable se puede utilizar para detectar el inmunoconjugado.
 60

La proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se puede "unir a" la molécula efectora por cualquier medio mediante el cual la proteína de unión pueda asociarse, o unirse a la molécula efectora. Por ejemplo, la proteína de unión se puede unir a la molécula efectora por medios químicos o recombinantes. Los medios químicos para preparar fusiones o conjugados son conocidos en la técnica y se pueden utilizar para preparar el inmunoconjugado. El método usado para conjugar la proteína de unión y la molécula
 65

efectora debe poder unir la proteína de unión con la molécula efectora sin interferir con la capacidad de la proteína de unión para unirse al antígeno de la célula cancerosa.

En una realización, la proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y la molécula efectora son ambas proteínas y se pueden conjugar usando técnicas bien conocidas en la materia. Existen varios cientos de reticulantes disponibles para conjugar dos proteínas. (Véase por ejemplo "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking". 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor). El reticulante se selecciona por regla general en función de los grupos reactivos funcionales disponibles o insertados en la proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y/o molécula efectora. Además, si no hay grupos reactivos, se puede utilizar un reticulante fotoactivable. En determinados casos, puede ser deseable incluir un separador entre la proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y molécula efectora. Los agentes reticulantes conocidos en la materia incluyen los agentes homobifuncionales: glutaraldehído, dimetiladipimidato y Bis(diazobenzidina) y los agentes heterobifuncionales: m Maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida y Sulfo-m Maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida.

Se puede preparar también una proteína de fusión de una proteína de unión-molécula efectora utilizando técnicas de ADN recombinante. En dicho caso se fusiona una secuencia de ADN que codifica la proteína de unión a una secuencia de ADN que codifica la molécula efectora, lo que da como resultado una molécula de ADN quimérico. La secuencia de ADN quimérico se transfecta a una célula hospedadora que expresa la proteína de fusión. Se puede recuperar la proteína de fusión del cultivo celular y purificarse usando técnicas conocidas en la materia.

Los ejemplos de unir una molécula efectora, que es una marca, a la proteína de unión incluyen los métodos descritos en Hunter, y col., Nature 144:945 (1962); David, y col., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, y col., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982); Wensel y Meares, Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983); y Colcher et al., "Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice", Meth. Enzymol., 121:802-16 (1986).

(D) Preparación de las proteínas de la invención

El experto en materia apreciará que las proteínas de la invención, tales como los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, e inmunoconjugados, pueden prepararse de cualquiera de diversas maneras, pero de forma más preferente se preparan utilizando métodos recombinantes.

Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico se pueden incorporar de una manera conocida a un vector de expresión adecuado que asegura una buena expresión de las proteínas de la invención. Los posibles vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a cósmidos, plásmidos, o virus modificados (por ejemplo, retrovirus de replicación defectiva, adenovirus y virus adenoasociados), siempre que el vector sea compatible con la célula hospedadora utilizada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula hospedadora", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas de acuerdo con las células hospedadoras que se van a utilizar para la expresión, que se unen operativamente a la molécula de ácido nucleico. Se pretende que operativamente unido signifique que el ácido nucleico está unido a las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

La invención contempla por tanto un vector de expresión recombinante de la invención que contiene una molécula de ácido nucleico o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y la traducción de la secuencia de proteína insertada.

Las secuencias reguladoras insertadas pueden derivarse de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamíferos, o de insectos (Por ejemplo, véanse las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). La selección de secuencias reguladoras adecuadas es dependiente de la célula hospedadora seleccionada como se describe a continuación, y una persona normalmente experta en la materia puede realizarla fácilmente. Los ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen: un promotor de la transcripción y un potenciador o una secuencia de unión a la ARN polimerasa, una secuencia de unión a ribosoma, incluyendo una señal de inicio de la traducción. De manera adicional, dependiendo de la célula hospedadora seleccionada y del vector empleado, otras secuencias tales como el origen de la replicación, los sitios adicionales de restricción del ADN, potenciadores, y las secuencias que confieren la inducibilidad de la transcripción se pueden incorporar al vector de expresión.

Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden incluir también un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables son genes que codifican una proteína tal como G418 e higromicina que confieren resistencia a determinados fármacos, β galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga, o una inmunoglobulina o parte de la misma tal como la parte Fc de una inmunoglobulina, preferentemente IgG. La transcripción del gen marcador seleccionable se controla mediante cambios en la

concentración de la proteína marcadora seleccionable tal como β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador seleccionable codifica una proteína que transmite resistencia a antibióticos tal como células transformantes con resistencia a neomicina, se puede seleccionar con G418. Las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán.

5 Esto hace posible visualizar y ensayar la expresión de vectores de expresión recombinantes de la invención y en particular determinar el efecto de una mutación en la expresión y el fenotipo. Se apreciará que los marcadores seleccionables se pueden introducir en un vector independiente del ácido nucleico de interés.

10 Los vectores de expresión recombinante pueden incluir también genes que codifican un resto de fusión que proporciona una mayor expresión de la proteína recombinante; una mayor solubilidad de la proteína recombinante; y ayudar en la purificación de la proteína recombinante diana actuando como ligando en una purificación por afinidad. Por ejemplo, se puede añadir un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante a partir del resto de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión.

15 Los vectores de expresión de la fusión usuales incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa E, o la proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante.

20 Se pueden introducir vectores de expresión recombinantes en células hospedadoras para producir una célula hospedadora transformada. Las expresiones "transformados con", "transfectado con", están previstas para abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante una de muchas técnicas posibles conocidas en la materia. Se pretende que la expresión "célula hospedadora transformada" tal como se usa en el presente documento incluya también células capaces de glicosilación que se han transformado con un vector de expresión recombinante de la invención. Se pueden transformar células procariotas con ácido nucleico mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro de calcio. Por ejemplo, se pueden introducir ácido nucleico en células de mamíferos mediante técnicas convencionales tales como precipitación simultánea con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada con DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección.

25 Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar y transfectar células hospedadoras en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)), y otros libros de texto de laboratorio.

30 Las células hospedadoras adecuadas incluyen una amplia variedad de células hospedadoras eucariotas y procariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención se pueden expresar en células de levadura o células de mamíferos. Se pueden encontrar otras células hospedadoras adecuadas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991). Además, las proteínas de la invención pueden expresarse en células procariotas, tales como *Escherichia coli* (Zhang et al., Science 303(5656): 371-3 (2004)).

35 Las células hospedadoras de levaduras y hongos adecuadas para realizar la presente invención incluyen, pero no se limitan a *Saccharomyces cerevisiae*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y diversas especies del género *Aspergillus*. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari et al., Embo J. 6:229-234 (1987)), pMFa (Kurjan y Herskowitz, Cell 30:933-943 (1982)), pJRY88 (Schultz et al., Gene 54:113-123 (1987)), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los protocolos para la transformación de levaduras y hongos son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la materia (véase Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978); Itoh et al., J. Bacteriology 153:163 (1983), y Cullen et al. (BioTechnology 5:369 (1987))).

45 Las células de mamíferos adecuadas para realizar la presente invención incluyen, entre otros: COS (por ejemplo, ATCC N° CRL 1650 o 1651), BHK (por ejemplo, ATCC N° CRL 6281), CHO (ATCC N° CCL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC N° CCL 2), 293 (ATCC N° 1573) y células NS-1. Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamíferos incluyen un promotor (por ejemplo, derivado de material vírico tal como polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus Simio 40), así como otras secuencias de control de la transcripción y de la traducción. Los ejemplos de vectores de expresión mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, B., Nature 329:840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman et al., EMBO J. 6:187-195 (1987)).

50 Dadas las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, se pueden realizar también fácilmente los promotores, terminadores, y los métodos para introducir vectores de expresión de un tipo adecuado en plantas, aves, y las células de insectos. Por ejemplo, en una realización, las proteínas de la invención pueden expresarse a partir de células vegetales (véase Sinkar et al., J. Biosci (Bangalore) 11:47-58 (1987), que revisa el uso de vectores de *Agrobacterium rhizogenes*; véase también Zambryski et al., Genetic Engineering, Principles and Methods, Hollaender y Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, Nueva York (1984). que describe el uso de vectores de expresión para células vegetales, incluyendo, entre otros, PAPS2022, PAPS2023, y PAPS2034)

60 Las células de insectos adecuadas para realizar la presente invención incluyen células y líneas de células de especies de *Bombyx*, *Trichoplusia* o *Spodoptera*. Los vectores de Baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insectos cultivadas (células SF 9) incluyen la serie pAc (Smith et al., Mol. Cell Biol. 3:2156-2165 (1983)) y la serie pVL (Lucklow, V.A., y Summers, M.D., Virology 170:31-39 (1989)). Se describen algunos sistemas de expresión de células de baculovirus-insectos adecuados para la expresión de las proteínas

recombinantes de la invención en el documento PCT/US/02442.

Como alternativa, las proteínas de la invención se pueden expresar también en animales transgénicos no humanos tales como, ratas, conejos, ovejas y cerdos (Hammer et al. Nature 315:680-683 (1985); Palmiter et al. Science 222:809-814 (1983); Brinster et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442 (1985); Palmiter y Brinster Cell 41:343-345 (1985) y patente de los Estados Unidos N° 4.736.866).

Las proteínas de la invención pueden prepararse también mediante síntesis química utilizando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tales como síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Assoc. 85:2149-2154 (1964); Frische et al., J. Pept. Sci. 2(4): 212-22 (1996)) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart (1987)).

Las proteínas de fusión del extremo N o el extremo C que comprenden las proteínas de la invención conjugadas con otras moléculas, tales como proteínas se pueden preparar mediante fusión, a través de técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen una proteína de la invención fusionada a la proteína seleccionada o a la proteína marcadora como se describe en el presente documento. La proteína recombinante de la invención puede conjugarse también con otras proteínas mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas pueden acoplarse utilizando enlazadores que contienen tioles heterobifuncionales tal como se describe en el documento WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditio-propionato) o N-succinimidil-5 tioacetato. Los ejemplos de proteínas que se pueden usar para preparar proteínas o conjugados de fusión incluyen proteínas de unión a célula tales como inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, lectinas, insulina, lipoproteínas de baja densidad, glucagón, endorfinas, transferrina, bombesina, asialoglicoproteína glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA), y myc truncada.

Por consiguiente, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la invención, las proteínas de unión, tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, e inmunoconjugados de la invención. Se describe también en el presente documento una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante de la invención.

(E) Métodos terapéuticos y composiciones farmacéuticas

Los inventores han demostrado que las proteínas de unión de la invención se unen a la interfase 5-v8 de CD44E y que las proteínas de unión de la invención se internalizan. Por tanto, las proteínas de unión de la invención se pueden usar para la administración dirigida de agentes bioactivos relevantes o medicamento, tales como agentes de formación de imágenes, radioactivos o citotóxicos.

En una realización, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención para tratar o prevenir el cáncer, donde la molécula efectora es un agente terapéutico contra el cáncer. En otra realización, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención, donde la molécula efectora es un agente terapéutico contra el cáncer, para tratar o prevenir el cáncer. Además, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención, donde la molécula efectora es un agente terapéutico contra el cáncer, que comprende el uso de un agente terapéutico contra el cáncer adicional para el tratamiento o la prevención simultánea, separada o secuencial o la prevención del cáncer.

En una realización de la invención, el cáncer incluye, sin limitación, cáncer de cuello de útero, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma espinocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama (tal como carcinoma, ductal, lobular, y de pezón), cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, y leucemia mielógena crónica), cáncer de cerebro, neuroblastoma, sarcomas, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, plasmacitoma, linfoma, y melanoma. En una realización preferida, el cáncer incluye, sin limitación, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de útero, y cáncer de cabeza y cuello.

La capacidad del inmunoconjugado de la invención para inhibir selectivamente o destruir las células cancerosas puede ensayarse fácilmente *in vitro* utilizando líneas de células cancerosas. Se puede determinar el efecto inhibitor selectivo de los inmunoconjugados de la invención, demostrando por ejemplo la inhibición selectiva de la proliferación celular de las células cancerosas.

Se puede medir la toxicidad basándose en la viabilidad celular, por ejemplo, se puede comparar la viabilidad de los cultivos de células cancerosas y normales expuestos al inmunoconjugado. Se puede evaluar la viabilidad celular mediante técnicas conocidas, tales como mediante ensayos de exclusión con azul tripan.

- En otro ejemplo, se pueden usar numerosos modelos para ensayar la eficacia de los inmunoconjugados de la invención. Thompson, E.W. et al. (Breast Cancer Res. Treatment 31:357-370 (1994)) ha descrito un modelo para la determinación de la invasividad de las células de cáncer de mama humano *in vitro* midiendo la proteólisis mediada por célula tumoral de la matriz extracelular y la invasión de células tumorales de la membrana basal reconstituida (colágeno, laminina, fibronectina, Matrigel o gelatina). Otros modelos de células cancerosas aplicables incluyen células cultivadas de adenocarcinoma de ovario (Young, T.N. et al. Gynecol. Oncol. 62:89-99 (1996); Moore, D.H. et al. Gynecol. Oncol. 65:78-82 (1997)), células de cáncer de tiroides folicular humano (Demeure, M.J. y col., World J. Surg. 16:770-776 (1992)), líneas celulares de melanoma humano (A-2058) y fibrosarcoma (HT-1080) (Mackay, A.R. et al. Lab. Invest. 70:781783 (1994)), y líneas celulares de carcinoma espinocelular (HS-24) y adenocarcinoma (SB-3) de pulmón (Spiess, E. y col., J. Histochem. Cytochem. 42:917-929 (1994)). Se ha descrito también un sistema de ensayo *in vivo* que implica el implante de tumores y la medida de crecimiento y metástasis tumoral en ratones lampiños atómicos (Thompson, E.W. et al., Breast Cancer Res. Treatment 31:357-370 (1994); Shi, Y.E. et al., Cancer Res. 53:1409-1415 (1993)).
- Se pueden formular los inmunoconjugados de la invención en composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. Las sustancias se pueden administrar a organismos vivos incluyendo seres humanos, y animales. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una sustancia puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y el peso del individuo, y la capacidad de la proteína recombinante de la invención para estimular una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas se pueden administrar diariamente, o la dosis se puede reducir proporcionalmente tal como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.
- Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer que comprende los inmunoconjugados de la invención, y un transportador farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente. En una realización preferida, la molécula efectora del inmunoconjugado de la composición farmacéutica es un agente terapéutico contra el cáncer, más preferentemente una toxina.
- La preparación farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de la invención se puede administrar sistémicamente. La preparación farmacéutica se puede administrar directamente al sitio del cáncer. Dependiendo de la ruta de administración, el inmunoconjugado puede revestirse en un material para proteger el compuesto de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.
- De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el inmunoconjugado se administra al paciente mediante administración directa. La invención contempla que la composición farmacéutica se administre en al menos una cantidad suficiente para conseguir el criterio de valoración, y si fuera necesario, comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Se describen también en el presente documento los métodos para reducir el riesgo de complicaciones posteriores a la cirugía que comprenden administrar una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención antes, durante, o después de la cirugía para tratar el cáncer.
- Las composiciones descritas en el presente documento se pueden preparar por métodos conocidos por sí mismos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a sujetos, de forma que una cantidad eficaz del principio activo se pueda combinar en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen vehículos adecuados, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985). Sobre esta base, las composiciones incluyen, aunque no de forma exclusiva, soluciones de las sustancias junto con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, e incluidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmóticas con los fluidos fisiológicos.
- Las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, polvos liofilizados o soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener además antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que convierten las composiciones en sustancialmente compatible con los tejidos de la sangre del receptor previsto. Otros componentes que pueden estar presentes en este tipo de composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Se pueden preparar disoluciones y suspensiones improvisadas para inyección a partir de polvos estériles, gránulos, comprimidos, o soluciones o soluciones concentradas. El inmunoconjugado se puede suministrar, a modo de ejemplo pero no como una limitación, en forma de un polvo liofilizado que se reconstituye con agua estéril o suero salino antes de su administración al paciente.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un transportador farmacéuticamente aceptable. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen esencialmente sustancias químicas esencialmente inertes y composiciones no tóxicas que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los ejemplos de los transportadores farmacéuticos adecuados incluyen, pero sin

limitación, agua, sueros salinos, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfotidil-etanolamina (DOPE), y liposomas. Dichas composiciones deberían incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, junto con una cantidad adecuada de transportador de forma que proporcione una forma para su administración directa al paciente.

La composición puede estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, las formadas con los grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con los grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilarnino etanol, histidina, procaína, etc.

La composición farmacéutica se puede administrar directamente de forma sistémica o directamente en la zona del tumor o tumores.

Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en métodos para tratar animales, incluyendo mamíferos, preferentemente seres humanos, con cáncer. La dosificación y tipo de inmunoconjugado a administrar dependerá de una variedad de factores que pueden controlarse fácilmente en sujetos humanos. Dichos factores incluyen la etiología y gravedad (grado y estadio) del cáncer.

El experto en la materia, como un médico, podrá discernir con facilidad los resultados clínicos de los tratamientos contra el cáncer que utilizan los inmunoconjugados de la invención. Por ejemplo, las pruebas médicas convencionales para medir marcadores clínicos del cáncer pueden ser indicadores fuertes de la eficacia del tratamiento. Dichas pruebas pueden incluir, sin limitación, exploración física, escalas de comportamiento, marcadores de enfermedad, ECG de doce puntas, medidas del tumor, biopsia de tejido, citoscopia, citología, mayor diámetro de cálculos tumorales, radiografía, imágenes digitales del tumor, signos vitales, peso, registro de acontecimientos adversos, evaluación de episodios infecciosos, evaluación de medicaciones concomitantes, evaluación del dolor, química de sangre o suero, análisis de orina, barrido TC, y análisis farmacocinético. Además, los efectos sinérgicos de un tratamiento combinado que comprende el inmunoconjugado y otro tratamiento contra el cáncer se pueden determinar mediante estudios comparativos con pacientes sometidos a monoterapia.

También se describe en el presente documento un kit para tratar o prevenir el cáncer que comprende una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención, y directrices para el uso del mismo para tratar el cáncer.

En la mayoría de tratamientos contra el cáncer autorizados, el tratamiento contra el cáncer se utiliza junto con otro tratamiento contra el cáncer. Por consiguiente, la invención proporciona un método para prevenir o tratar el cáncer usando el inmunoconjugado de la invención junto con al menos un tratamiento del cáncer adicional. El otro tratamiento contra el cáncer se puede administrar antes, junto con, en paralelo, y/o después de la administración del inmunoconjugado. Cuando se administra en paralelo, el inmunoconjugado y el otro agente terapéutico de cáncer se puede administrar en una formulación única o en formulaciones individuales, y si es por separado, entonces opcionalmente, mediante diferentes modos de administración. La combinación de uno o más inmunoconjugados y uno o más tratamientos contra el cáncer puede actuar sinérgicamente para combatir el tumor o el cáncer. Los otros tratamientos incluyen, sin limitación, radiación y otros agentes terapéuticos contra el cáncer. Estos otros agentes terapéuticos contra el cáncer pueden incluir, sin limitación, 2,2',2"-triclorotrietilamina, 6-azauridina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, 6-mercaptopurina, aceglarona, aclacinomicinas, actinomicina, altretamina, aminoglutetimida, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, ancitabina, oligonucleótido de sentido contrario de angiogenina, antramizina, azacitidina, azaserina, aziridina, batimastar, oligonucleótido de sentido contrario dbcl-2, benzodepa, bicalutamida, bisantreno, bleomicina, buserelina, busulfan, cactinomicina, calusterona, carboplatino, carbocina, carminomicina, carmofur, carmustina, carrubicina, carzinofilina, clorambucilo, clornafazina, acetato de clormadinona, clorozotocina, cromomicinas, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, defosfamida, demecolcina, denopterina, detorubicina, diazicuona, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, droloxifeno, dromostanolona, edatrexato, eflomitina, acetato de eliptinio, emitefur, enocitabina, epirubicina, epitiostanol, esorubicina, estramustina, etoglúcido, etopósido, fadrozol, fenretinida, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, formestano, fosfestrol, fotemustina, nitrato de galio, gemcitabina, goserelina, hexestrol, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, improsulfano, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleuquina-2, L-asparaginasa, lentinano, letrozol, leuprólido, lomustina, lonidamina, manomustina, marcelomicina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melengestrol, melfalano, menogaril, mepitiostano, metotrexato, meturedopa, miboplatino, miltefosina, mitobronitol, mitoguazona, mitolactol, mitomicinas, mitotano, mitoxantrona, mopidamol, ácido micofenólico, nilutamida, nimustina, nitracina, nogalamicina, novombiquina, olivomicinas, oxaliplatino, paclitaxel, pentostatina, peplocina, perfosfamida, fenamet, fenesterina, pipobromano, pipsulfano, pirarubicina, piritrexim, plicamicina, 2-etil hidrazida del ácido podofilínico, fosfato de poliestradiol, porfimer sódico, porfiromicina, prednimustina, procabazina, propagermanio, PSK, pteropterina, puromicina, quelamicina, ranimustina, razoxano, rodorubicina, roquimex, sizofican, sobuzoxano, espirogermanio, estreptonigrina, estreptoocina, tamoxifeno, taxotere, tegafur, temozolomida, tenipósido, ácido tenuazónico, testolacono, tiamiprina, tioguanina, tiotepa, Tomudex, topotecan, toremifeno, triazicuona, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, trilostano, trimetrexato, triptorelina, trifosfamida, trontecano, tubercidina, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, uretano, vinblastina, vincristina, zinostatina, y zorrubicina, arabinósido de citosina, gemtuzumab, tiotepa, ciclotosfamida, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato,

6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, dacarbazina, temozoamida), hexametilmelamina, LYSODREN, análogos de nucleósido, alcaloides vegetales (por ejemplo, Taxol, paclitaxel, camptotecina, topotecan, irinotecano (CAMPTOSAR, CPT-11), vincristina, alcaloides de la vinca tales como vinblastina), podofilotoxina, epipodofilotoxina, VP-16 (etopósido), citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorubicina liposomal, dihidroxiantacindiona, mitramicina, actinomicina D, aldesleucina, alulamina, biaomicina, capecitabina, carboplatino, clorabúsín, ciclarabina, daclínomicina, floxurida, acetato de lauprolida, levamisol, lomuslina, mercaptopurino, mesna, mitolanc, pegaspergase, pentoslatín, picamicina, riuxlmab, campat-1, estraplozocina, tretinoína, oligonucleótido de sentido contrario de VEGF, vindesina, y vinorelbina. Las composiciones que comprenden uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer (por ejemplo, FLAG, CHOP) también están abarcados en la presente invención. FLAG comprende fludarabina, arabinósido de citosina (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, y prednisona. Para un listado completo de los agentes terapéuticos contra el cáncer conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, las últimas ediciones de The Merck Index y del Physician's Desk Reference.

Las composiciones farmacéuticas para tratamiento combinado también pueden incluir, sin limitación, antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina, antramycin, asparaginasa, bacilo de Guerin, toxina diftérica, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, agentes antimetabólicos, abrina, ricina, exotoxina de Pseudomonas, factores de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, agentes antihistamínicos, agentes anti-naúsea, etc.

Así, la administración de una cantidad eficaz de un inmunoconjugado a un paciente que necesita dicho tratamiento puede dar como resultado una reducción en la dosis de otro agente terapéutico contra el cáncer que tenga una eficacia clínica significativa. Dicha eficacia de la dosis reducida del otro agente terapéutico contra el cáncer puede no observarse en ausencia de la administración con un inmunoconjugado. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para tratar un tumor o cáncer que comprende administrar una dosis reducida de uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer.

Además, el tratamiento combinado que comprende un inmunoconjugado a suministrar a un paciente que necesita dicho tratamiento puede permitir plazos de tratamiento relativamente cortos si se comparan con la duración o el número de ciclos de los regímenes de tratamiento convencionales. También se describen en el presente documento métodos para tratar un tumor o cáncer que comprenden administrar uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales durante un corto plazo de tiempo y/o en menos ciclos de tratamiento.

Por tanto, los tratamientos combinados que comprenden un inmunoconjugado y otro agente terapéutico contra el cáncer pueden reducir la toxicidad (es decir, los efectos secundarios) del tratamiento del cáncer global. Por ejemplo, se puede observar toxicidad reducida, cuando se compara con una monoterapia u otro tratamiento combinado, cuando se administra una dosis reducida del inmunoconjugado y/o del otro agente terapéutico contra el cáncer, y/o cuando se reduce la duración de un ciclo (es decir, el periodo de administración individual o el periodo de una serie de dichas administraciones), y/o cuando se reduce el número de ciclos.

Por consiguiente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado y uno o más agentes terapéuticos adicionales contra el cáncer, opcionalmente en un transportador farmacéuticamente aceptable.

También se describe en el presente documento un kit que comprende una cantidad eficaz de un inmunoconjugado, de manera opcional, junto con uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales, junto con instrucciones para el uso de los mismos para tratar el cáncer.

Como se afirma anteriormente, el tratamiento combinado con un inmunoconjugado puede sensibilizar el cáncer o el tumor para la administración de un agente terapéutico contra el cáncer adicional. Por consiguiente, la presente invención contempla los tratamientos combinados para prevenir, tratar, y prevenir la recurrencia del cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz de un inmunoconjugado antes de, posteriormente, o en paralelo con una dosis reducida de un agente terapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, el tratamiento inicial con un inmunoconjugado puede aumentar la sensibilidad de un cáncer o tumor a un estímulo posterior con una dosis de un agente terapéutico contra el cáncer. Esta dosis está cercana, o es inferior, al intervalo inferior de las dosificaciones habituales cuando el agente terapéutico contra el cáncer se administra en solitario, o en ausencia de un inmunoconjugado. Cuando se administrarse simultáneamente, el inmunoconjugado puede administrarse por separado del agente terapéutico contra el cáncer, y opcionalmente, mediante un modo diferente de administración.

Por consiguiente, en una realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende cisplatino, por ejemplo, PLATINOL o PLATINOL-AQ (Bristol Myers), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 5 y 10, 11 a 20, 21 a 40, o 41 a 75 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende carboplatino, por ejemplo, PARAPLATIN (Bristol Myers), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 2 y 3, 4 a 8, 9 a 16, 17 a 35, o 36 a 75 mg/m²/ciclo.

- En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende ciclofosfamida, por ejemplo, CYTOXAN (Bristol Myers Squibb), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 0,25 y 0,5, 0,6 a 0,9, 1 a 2, 3 a 5, 6 a 10, 11 a 20, o 21 a 40 mg/kg/ciclo.
- 5 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende citarabina, por ejemplo, CYTOSAR-U (Pharmacia & Upjohn), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 0,5 y 1, 2 a 4, 5 a 10, 11 a 25, 26 a 50, o 51 a 100 mg/m²/ciclo. En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende citarabina liposomal, por ejemplo, DEPOCYT (Chiron Corp.), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 5 y 50 mg/m²/ciclo.
- 10 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende dacarbazina, por ejemplo, DTIC o DTICDOME (Bayer Corp.), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 15 a 250 mg/m²/ciclo o en un intervalo de aproximadamente 0,2 a 2 mg/kg/ciclo.
- 15 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende topotecano, por ejemplo, HYCAMTIN (SmithKline Beecham), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 0,1 y 0,2, 0,3 a 0,4, 0,5 a 0,8, o 0,9 a 1,5 mg/m²/ciclo. En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende irinotecano, por ejemplo, CAMPTOSAR (Pharmacia & Upjohn), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 5 y 9, 10 a 25, o 26 a 50 mg/m²/ciclo.
- 20 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende fludarabina, por ejemplo, FLUDARA (Berlex Laboratories), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 2,5 y 5, 6 a 10, 11 a 15, o 16 a 25 mg/m²/ciclo.
- 25 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende arabinósido de citosina (Ara-C) a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 200 y 2000 mg/m²/ciclo, 300 a 1000 mg/m²/ciclo, 400 a 800 mg/m²/ciclo, o 500 a 700 mg/m²/ciclo.
- 30 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende docetaxel, por ejemplo, TAXOTERE (Rhône-Poulenc Rorer) a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 6 y 10, 11 a 30, o 31 a 60 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende paclitaxel, por ejemplo, TAXOL (Bristol Myers Squibb), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 10 y 20, 21 a 40, 41 a 70, o 71 a 135 mg/kg/ciclo.
- 35 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende 5-fluoracilo a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 0,5 y 5 mg/kg/ciclo, 1 a 4 mg/kg/ciclo, o 2-3 mg/kg/ciclo.
- 40 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende doxorubicina, por ejemplo, ADRIAMICINA (Pharmacia & Upjohn), DOXIL (Alza), RUBEX (Bristol Myers Squibb), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 2 y 4, 5 a 8, 9 a 15, 16 a 30, o 31 a 60 mg/kg/ciclo.
- 45 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende etopósido, por ejemplo, VEPESID (Pharmacia & Upjohn), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 3,5 y 7, 8 a 15, 16 a 25, o 26 a 50 mg/m²/ciclo.
- 50 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende vinblastina, por ejemplo, VELBAN (Eli Lilly), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 0,3 y 0,5, 0,6 a 0,9, 1 a 2, o 3 a 3,6 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende vincristina, por ejemplo, ONCOVIN (Eli Lilly), a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 a 0,7 mg/m²/ciclo.
- 55 En otra realización, el agente terapéutico contra el cáncer adicional comprende metotrexato a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 0,2 y 0,9, 1 a 5, 6 a 10, u 11 a 20 mg/m²/ciclo.
- En otra realización, se administra un inmunocombinado junto con al menos otro agente inmunoterapéutico que incluye sin limitación, rituxan, rituximab, campat-1, gemtuzumab, y trastuzumab.
- 60 En otra realización, se administra un inmunocombinado junto con al uno o más agentes antiangiogénicos que incluyen sin limitación, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, Serpin (inhibidor de la serina proteasa), anti-trombina, fragmentos proteolíticos de fibronectina, 29 kDa del extremo N y 40 kDa del extremo C, fragmento proteolítico de 16 kDa de prolactina, fragmento proteolítico de 7,8 kDa del factor plaquetario 4, un péptido de 13 aminoácidos que corresponde a un fragmento del factor plaquetario 4 (Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083), un péptido de 14 aminoácidos que corresponde a un fragmento de colágeno (Toma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511), un péptido de 19 aminoácidos que corresponde a un fragmento de trosbopondina I (Tolsma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511), un péptido de 20 aminoácidos que corresponde a un fragmento de SPARC (Sage et
- 65

al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334), y sus variantes, incluyendo una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, se administra un inmunoconjugado junto con un régimen de radioterapia. El tratamiento también puede comprender cirugía y/o quimioterapia. Por ejemplo, el inmunoconjugado se puede administrar junto con radioterapia y cisplatino (Platinol), fluorouracilo (5-FU, Aduvicol), carboplatino (Paraplatin), y/o paclitaxel (Taxol). El tratamiento con el inmunoconjugado puede permitir el uso de dosis menores de radiación y/o una radioterapia menos frecuente, que por ejemplo puede reducir la incidencia de escariaciones graves en la garganta que impidan la función del tragado que potencialmente den como resultado una pérdida de peso y una deshidratación.

En otra realización, se administra un inmunoconjugado junto con la una o más citoquinas que incluyen sin limitación, una linfoquina, factores de necrosis tumoral, citoquina análoga al factor de necrosis tumoral, linfotoxina, interferón, proteína inflamatoria de los macrófagos, factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos, interleuquina (incluyendo, sin limitación, interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-6, interleuquina-12, interleuquina-15, interleuquina-18), y sus variantes, incluyendo una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización adicional, se administra un inmunoconjugado junto con una vacuna del cáncer o agentes biológicos que incluyen, sin limitación, células o tejidos autólogos, células o tejidos no autólogos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna de BCG vivo, complejos de ADN con la pared celular de micobacterias, proteínas del linaje de los melanocitos, y antígenos específicos de tumores mutados.

En otra realización adicional, se administra un inmunoconjugado junto con un tratamiento hormonal. Los productos terapéuticos dirigidos hormonales incluyen, sin limitación, un agonista hormonal, antagonista hormonal (por ejemplo, flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON)), y un esteroide (por ejemplo, dexametasona, retinoide, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoide, mineralocorticoide, estrógeno, testosterona, progestina).

En otra realización adicional, se administra un inmunoconjugado junto con un programa de tratamiento génico para tratar o prevenir el cáncer.

De esta forma, el tratamiento combinado puede aumentar la sensibilidad del cáncer o el tumor al inmunoconjugado administrado y/o al agente terapéutico contra el cáncer adicional. De esta manera, pueden ser posibles ciclos de tratamiento más cortos, reduciendo de esta forma los acontecimientos tóxicos. La duración del ciclo puede variar de acuerdo en el tratamiento contra el cáncer específico en uso. La invención también contempla la administración continua o discontinua, o bien dosis diarias divididas en varias administraciones parciales. El experto en la materia apreciará la duración adecuada del ciclo para un agente terapéutico contra el cáncer, y la invención contempla la evaluación continua de los calendarios de tratamiento óptimos para cada agente terapéutico contra el cáncer. Son conocidas en la materia las guías específicas dirigidas al experto en la materia. Véase, por ejemplo, Therasse et al., 2000, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," J Natl Cancer Inst. Feb 2;92(3):205-16.

Se contempla que el inmunoconjugado pueda administrarse mediante cualquier método adecuado tal como mediante inyección, administración oral, inhalación, transdérmica o intratumoral, mientras que cualquier otro agente terapéutico contra el cáncer se puede administrar al paciente mediante el mismo modo de administración u otro modo. De manera adicional, cuando se pretende administrar al paciente varios agentes terapéuticos contra el cáncer, el inmunoconjugado y uno o más del resto de agentes terapéuticos contra el cáncer se pueden administrar por un método, mientras que otros agentes terapéuticos contra el cáncer se pueden administrar mediante otro modo de administración.

(F) Métodos y agentes diagnósticos

Las proteínas de unión de la invención se unen selectivamente a células cancerosas o a moléculas internalizadas por las células cancerosas, y no significativa a células normales. Por tanto, las proteínas de unión se pueden utilizar en el diagnóstico del cáncer. Como se afirma anteriormente, los inventores han demostrado que las proteínas de unión de la invención se unen al dominio extracelular de CD44E. Por tanto, la especificidad de las proteínas de unión por los antígenos tumorales las convierte en útiles para el diagnóstico del cáncer.

En una realización preferida, las proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. Además, las células cancerosas se pueden evaluar para determinar sus susceptibilidad a los métodos de tratamiento de la invención, por ejemplo, por obtención de una muestra de las células cancerosas y determinar la capacidad de la muestra para unirse a las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

Por consiguiente, la presente invención incluye agentes diagnósticos que se pueden utilizar por sí mismos o antes de, durante o después de los usos terapéuticos de la invención para determinar si las células cancerosas presentes expresan o no el antígeno y se pueden unir a las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

5 En una realización, la invención proporciona un método para diagnosticar el cáncer en un mamífero que comprende las etapas de

- 10 (1) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho mamífero con las proteínas de unión de la invención que se une a un antígeno en o de la célula cancerosa en condiciones que permiten la formación de un complejo proteína de unión-antígeno;
- (2) medir la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo; y
- (3) comparar la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo con la de un control.

15 La presente solicitud también describe un kit para el diagnóstico del cáncer que comprende una cualquiera de las proteínas de unión de la invención e instrucciones para su uso en el diagnóstico del cáncer.

20 Para su uso en las aplicaciones de diagnóstico, las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, se pueden etiquetar con un marcador detectable tal como una sustancia radio-opaca o un radioisótopo, tales como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente de formación de imágenes; o un ion metálico. Tal como se ha descrito anteriormente, los métodos para unir una marca a una proteína de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, son conocidos en la técnica.

25 También se describe en el presente documento un método para diagnosticar el cáncer en un mamífero que comprende las etapas de

- 30 (1) medir la cantidad de anticuerpos de la invención en una muestra de ensayo tomada de dicho mamífero; y
- (2) comparar la cantidad de anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo con la de un control.

35 En una realización, la cantidad de anticuerpos de la invención se determina midiendo la cantidad de anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo, por ejemplo mediante ELISA. En otra realización, la cantidad de anticuerpos de la invención se determina midiendo los niveles de expresión de los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo, por ejemplo mediante RT-PCR.

(G) Antígenos

40 Como se ha mencionado anteriormente, los inventores han identificado el antígeno de las proteínas de unión de la invención. Por consiguiente, la invención incluye una proteína aislada que se puede unir específicamente con una de las proteínas de unión de la invención, y sus usos.

(H) Otros usos de las proteínas de unión de la invención

45 Se ha demostrado que los anticuerpos de CD44 bloquean la unión de CD44H inducida por PMA (la forma normalizada, también denominada CD44s) y CD44E al ácido hialurónico (AH) (Liao et al. J Immunol 151(11):6490-99, 1993). La agrupación de variantes de CD44, especialmente las que contienen el exón variante 9 parece ser importante para la unión a AH y se puede inducir mediante PMA. La señalización intracelular posterior está relacionada con esta agrupación y su interferencia puede afectar a la función celular (Suzuki et al., JBC 277(10):8022-32, 2002). Es posible que el efecto bloqueante de los anticuerpos sobre la unión de AH esté mediada por la interferencia con la agrupación. Sin tener en cuenta el mecanismo, las proteínas de unión de la invención se podrían usar para modular la unión de CD44 a las moléculas extracelulares y la señalización celular posterior resultante de la agrupación, o la unión con el AH u/u otras moléculas extracelulares.

55 También se describe en el presente documento el uso de las proteínas de unión de la invención para modular la actividad de CD44E. Por ejemplo, las proteínas de unión de la invención se pueden usar para interferir la unión de CD44E a HA. Las proteínas de unión de la invención también se pueden usar para potenciar la actividad de CD44E.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención:

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación del anticuerpo monoclonal VB1-008

65 El anticuerpo monoclonal VB1-008 se generó a partir de linfocitos de sangre periférica de una paciente con cáncer de mama. Se usó TM-SH-P2 como ligando para generar el anticuerpo monoclonal. VB1-008 es un anticuerpo

monoclonal IgG1 lambda.

El ARN mensajero (ARNm) se aisló de células de hibridoma y se sintetizó la primera hebra complementaria del ADN (ADNc). A continuación, el ADNc se utilizó para aislar los genes de las cadenas H y L del anticuerpo mediante PCR. Se diseñaron los cebadores de PCR (véase la nota) de acuerdo con las regiones marco de consenso de los isotipos de la cadena H (gamma) y L (lambda). Los productos de la PCR se clonaron individualmente en el vector TOPO-pCR 2.1 y se transformaron en células *E. coli*. Se aislaron e hicieron crecer clones que contenían las inserciones en TOPO-pCR 2.1. El ADN plásmido se purificó y se secuenció.

10 Cebadores gamma:

- 1) 5' TCT AAA GAA GCC CCT GGG AGC ACA GCT CAT CAC CAT G 3' (SEC ID N°: 18)
- 2) 5' GCC CGG GGA GCG GGG GCT TGC CGG CCG TCG CAC TCA 3' (SEC ID N°: 19)
- 3) 5: ACC ATG AGT GAG AAA AAC TGG ATT TGT GTG GCA 3' (SEC ID N°: 20)
- 4) 5' GGA GCC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA 3' (SEC ID N°: 21)
- 5) 5' CTC ACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT 3' (SEC ID N°: 22)
- 6) 5' GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC 3' (SEC ID N°: 23)

20 Cebadores lambda:

- 7) 5' GGC TCG AGA TGR CCT GSW CYC CTC TCY TYC TSW YC 3' (SEC ID N°: 24)
- 8) 5' CCC GTC GAC GAA GCT CCT TCA GAG GAG GG 3' * (SEC ID N°: 25)

25 Nota: Para aislar tantas variedades como sea posible usando un único cebador, se usarán base mixtas para determinados cebadores de consenso: R = A + G, D = A + T + G, Y = C + T, H = A + C + T, V = A + C + G, K = T + G, S = C + G, W = A + T.

Cada reacción de la PCR incluyó los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 µl.

- tampón 10x PCR 5 µl
- 30 dNTP 2 mM 5 µl
- MgCl₂ 50 mM 2 µl
- Cebador 5' 20 pmol
- Cebador 3' 20 pmol
- Polimerasa Taq ADN 2,5 U
- 35 Molde de ADN 50 ng

Las condiciones de ciclación de PCR fueron: 94 °C para 1 min., 62 °C para 1 min., 72 °C para 1,5 min durante 30 ciclos y una extensión final durante 10 min a 72 °C. Los productos de la PCR amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, se recortaron se purificaron en un kit de extracción en gel Qiaquick, se clonaron en el vector de clonación TOPO pCR 2.1 y a continuación se secuenció el ADN mediante un secuenciador 373 DNA Stretch (Griffin G.H. y Griffin M.A.: PCR technology, Current innovations. CRC Press, Boca Raton. Florida3431.USA; Vector de clonación pCR 2.1, n° de catálogo 205184. Invitrogen, Carlsbad, CA; Qiagen, kit de extracción en gel Qiaquick, n° de catálogo 28706. Qiagen Inc., Mississauga, ON; y 373 DNA Stretch. PE Applied Biosystems, Mississauga ON.).

45 Las secuencias de la CDR de VB1-008 se muestran en la Tabla 1.

La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada se muestran en la Figura 1 y 2, respectivamente.

50 **Ejemplo 2: Perfilado de anticuerpo por medida de la reactividad de la célula tumoral**

VB1-008 se sometió a ensayo mediante citometría de flujo para determinar la reactividad de las células tumorales frente a dos paneles de líneas celulares. El primer panel comprende quince tipos diferentes de cánceres epiteliales, mientras que un segundo panel consiste en cinco tipos de células normales. Los resultados de VB1-008 se resumen en la Tabla 2. VB1-008 tuvo un MF > 2,0 para todos los tipos de cáncer ensayados. Los valores de MF indican la media calculada a partir de la suma del incremento promedio, en número de veces, de la fluorescencia media compara do en anticuerpo de control para todas las líneas celulares de cada indicación. Las indicaciones más intensas fueron, pero sin limitarse a, mama, pulmón, melanoma y próstata. En comparación, VB1-008 fue más reactivo para la mayoría de líneas celulares tumorales que para las líneas celulares normales. Las dos excepciones fueron las líneas celulares de riñón y pulmón; sin embargo, siguieron siendo más bajos que los tipos de células tumorales correspondientes. Véase la Tabla 2. El número de veces de aumento en la reactividad frente a VB1-008 del tumor: normal varió de ~2 a 7.

65

Ejemplo 3: Micromatriz de tejido normal

VB1-008 se sometió a ensayo mediante citometría de flujo de nuevo frente a la línea celular SKBR-3, positiva para tumor, para evaluar el formato de tejido correcto para demostrar la tinción de la membrana y para definir las condiciones de tinción óptimas. Este anticuerpo demuestra tinción citoplásmica y de la membrana celular en todos los grupos experimentales, incluyendo las células incluidas fijadas. En los aglomerados celulares fijados incubados durante la noche con VB1-008, el 80 % de las células mostraron tinción citoplásmica, y el 10 % de estas mostraron tinción de la membrana celular. Se muestran en la Figura 3 fotografías representativas de la tinción de la membrana celular para núcleos aglomerados de células fijadas con formalina.

Una vez se han identificado las condiciones de tinción óptimas, el anticuerpo se sometió a ensayo en comparación con un control de isotipo (4B5) en una matriz de baja densidad (LD) crítica normal para la reactividad de tejido normal. Los resultados de VB1-008 se resumen en la Tabla 3. No se observó ninguna tinción significativa de membrana en ninguno de los tejidos críticos normales. La matriz de tinción de alta densidad (HD) de tejido normal no crítico mostró que la tinción de la superficie celular quedó limitada a las células epiteliales asociadas con tejidos relacionados con la reproducción (testículos y trompas de Falopio, Figura 4, Tabla 4). Por otra parte, no se observó una tinción significativa de ninguno de los tejidos de ninguno de los tejidos.

Ejemplo 4: Micromatriz de tejido tumoral

VB1-008 se sometió a ensayo en un TMA de tumor fijado con formalina Hd para determinar la reactividad del tejido tumoral. Véase la Tabla 5. VB1-008 mostró una reactividad moderada de la superficie celular frente a una amplia variedad de indicaciones, entre las que se incluyen vejiga, mama, colon, riñón, hígado, de ovario, próstata, recto, estómago y útero. La unión de VB1-008 a la superficie celular estuvo menos representada y a una reactividad inferior con cánceres de cuello de útero, pulmón, páncreas, y piel. En las Figuras 5-7 se muestran fotografías representativas que ilustran la reactividad de VB1-008 a la superficie celular pero no el anticuerpo control emparejado por isotipo para algunos de los cánceres.

Ejemplo 5: Evaluación de la unión de VB1-008 e internalización mediante**citometría de flujo y microscopía confocal:**

VB1-008 y dos anticuerpos de control (5E9 y MA-103) que demostraron reactividad intensa contra la línea celular tumoral A-375 se utilizaron para evaluar la internalización de VB1-008. Se muestra un experimento representativo en la Tabla 6. Los resultados de la unión de VB1-008 a diferentes temperaturas no fueron diferentes del anticuerpo internalizante 5E9. Después de 60 min a 37 °C, el VB1-008 unido a membrana desapareció de la superficie celular, con una reducción del 57,5 % en la fluorescencia media. El aumento en el tiempo de incubación a 37 °C estuvo asociado con un declive adicional en la fluorescencia media. A 120 min, la fluorescencia media había disminuido en un 62,2 %. En la Figura 8 se ilustran histogramas de flujo que demuestran la unión a la superficie celular. Para confirmar si el VB1-008 unido a la superficie celular quedó internalizado en las células A-375 o en su lugar fue emitido desde la membrana plasmática, las células tratadas con anticuerpo se evaluaron mediante la visualización directa de la distribución de la fluorescencia y la tinción intracelular con ayuda de un microscopio confocal de barrido con láser. Análogamente a MA-103 y 5E9, la incubación de las células A-375 con VB1-008 a 4 °C durante 60 min demostró una distribución superficial perimetral en la marca fluorescente (Figura 9A). El calentamiento de las células unidas a VB1-008 a 37 °C reveló un modelo puntuado de tinción intracelular mediante el anticuerpo internalizado en un plazo de 60 minutos, tal como se muestra en la Figura 9B.

Ejemplo 6: Afinidad de unión

La citometría de flujo se utilizar para evaluar la afinidad funcional [Benedict, C.A., NacKrell, A.J. y Anderson, W.F. (1997) J. Immunol. Methods, 201:223-231]. Una gama de concentraciones de anticuerpo se sometió a ensayo frente a un número fijo de células tumorales (A-375) durante 2 horas para construir una curva de saturación. Los valores y los análisis gráficos se generaron mediante Sigma Plot (Jandel Scientific, San Rafael, CA). La inversa de la fluorescencia media determinada se representó gráficamente en función de la inversa de la concentración del anticuerpo para determinar el valor de KD mediante el método de Lineweaver-Burk. Se generó una línea rectal y el valor de KD se calculó a partir de la pendiente de la curva. Los valores de la constante de disociación KD se determinaron mediante la siguiente ecuación: $1/F = 1/F_{\text{máx}} + (KD/F_{\text{máx}})(1/IgG \text{ o } IgM \text{ o } scFv)$, donde F= fluorescente media tras resta del valor del fondo, y F_{máx} se calculó de la gráfica. El valor de la constante de disociación para VB1-008 demostró ser 5,88x10⁻⁸ M.

Ejemplo 7: Identificación del antígeno VB1-008**Células**

Las líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB 435S, MDA-MB-231; MCF-7; línea celular de melanoma, A-375; línea celular de tumor pancreático, PANC-1 y líneas de linfocitos T, Daudi y Ramos se utilizaron en el estudio (Tabla

7). Estas líneas celulares fueron seleccionadas por los resultados del perfilado de la línea celular tumoral mediante citometría de flujo.

Crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares tumorales

5 Las líneas celulares del estudio se adquirieron de ATCC y se cultivaron de acuerdo con las directrices y las recomendaciones de ATCC. Las células se recogieron a un 90 % de confluencia con una viabilidad >90 %.

Caracterización preliminar de la unión del antígeno a VB1-008

10 Los datos de caracterización preliminar se obtuvieron de experimentos diseñados para evaluar la factibilidad del enfoque basado en gel mediante ensayo de hibridación puntual; y de experimentos realizados para determinar la naturaleza del epítipo asociado con los antígenos.

15 Los datos de estos experimentos clasificaron el antígeno VB1-008 como un antígeno "hibridable" con un epítipo péptido, es decir, el epítipo implicado en la unión a VB1-008 sobre el antígeno ni se glicosiló ni se asoció a lípidos. Debe indicarse que el antígeno se podía glicosilar en sitios diferentes al sitio de unión.

Enriquecimiento y purificación de VB1-008 Ag

Immunoprecipitación

20 Se utilizó un mínimo de 500 µg de proteína de membrana para la purificación mediante inmunoafinidad. La primera etapa de purificación del antígeno antes de la adición del anticuerpo fue una etapa de pre-aclaramiento usando proteína G-sefarosa. En algunos casos, el preaclaramiento se realizó dos veces y añadió más rigor al ensayo. Se usaron un total de 15-20 µg del anticuerpo como agente de precipitación en la mezcla. Las mezclas antígeno-anticuerpo se maduraron durante la noche a 4 °C usando condiciones de tampón que minimizan condiciones fisiológicas. Se tuvo cuidado para garantizar que se usaron inhibidores de la proteasa en cada una de las etapas del proceso de aislamiento del antígeno.

25 Se centrifugaron los complejos inmunes, se lavaron con tampón de lisis RIP-A y se eluyeron con citrato de sodio 0,2 mM a pH 2,5. Los sobrenadantes que representaban las fracciones no unidas se almacenaron con las proteínas de ensayo que no se aislaron mediante purificación por afinidad. Se realizaron las inmunoprecipitaciones de las dos líneas celulares muy positivas, es decir, A-375 y MDA-MB-435S, una línea celular moderadamente positiva, MDA-MB-231; una línea celular débilmente positiva, es decir, MCF-7; y tres líneas celulares negativas, es decir, Panc-1; Daudi y Ramos, con VB1-008 y cantidades iguales de 4B5 (control emparejado por isotipo) se procesaron en paralelo en todo momento.

Análisis basado en gel y transferencia Western

1D-PAGE

35 Las proteínas purificadas se sometieron a condiciones reductoras y no reductoras de preparación de la muestra y posteriormente se analizaron mediante SDS-PAGE/transferencia Western. Cuando se utilizaron condiciones reductoras, los antígenos aislados se trataron con tampón de muestra que contenía β-mercaptoetanol al 1 % a 65 °C durante 15 minutos y cuando se utilizaron condiciones no reductoras, los antígenos se mezclaron con tampón de muestra desprovista de cualquier agente reductor. Las transferencias resultantes se sondearon con los anticuerpos necesarios y los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con una HRP para visualizar las proteínas inmunopurificadas mediante quimioluminiscencia.

2D-PAGE

40 Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante electroforesis en gel bidimensional para resolver cualquier efecto de apilado de proteínas que se podría haber producido en el análisis 1 D-PAGE. La electroforesis en gel bidimensional resolvió las proteínas de acuerdo con sus puntos isoeléctricos (Pi) en la primera dimensión y sobre la base de sus pesos moleculares en la segunda dimensión. Las proteínas así resueltas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, durante la noche, y se procesaron como en el caso de 1 D-PAGE. Las transferencias Western se sondearon con VB1-008, anti-CD44 y anti-AFP tal como se necesita, y las proteínas que han reaccionado se visualizaron mediante quimioluminiscencia.

Extracción de péptido e ID de antígeno

45 Las proteínas se recortaron de los geles monodimensionales y bidimensionales y se analizaron. Los datos brutos se obtuvieron prediciendo las proteínas probables basándose en el número de péptidos recibidos. Los análisis mediante CL-EM/EM se realizaron en equipos 'QSTAR- y LCQ-dodeca CL-EM/EM de Thermo Finnigan. También se realizó una secuenciación *de-novo* de las proteínas identificadas en la misma instalación.

Ejemplo 7(a) 1D-PAGE/Análisis western

5 Solamente se detectó una banda específica después de la separación en un 1D-PAGE a ~110 kDa en condiciones no reductoras (Figura 10A) en líneas celulares positivas para antígeno (A-375, MDA-MB-435S). La misma banda se detectó débilmente en las líneas celulares débilmente positivas (MCF-7) y estuvo ausente en la línea celular negativa para el antígeno (Daudi). Cuando las muestras se separaron en SDS-PAGE en condiciones reductoras de preparación de la muestra, se observó una banda predominante a ~50 kDa y una débil a 110 kDa que se expresaron intensamente en líneas celulares positivas para el antígeno, MDA-MB-435S, A-375, MDA-MB-231, expresada débilmente en MCF-7, y ausente en las líneas celulares negativas para el antígeno, tal como Daudi y Panc-1 (Figura 10B; Figura 10C); Ramos fue una excepción a las observaciones anteriores (Figuras 11B y 10C). Ninguna de las líneas celulares mostró inmunoprecipitación positiva con 4B5. Los datos Western se resumen en la Tabla 8.

15 Para determinar la especificidad de unión de los antígenos detectados mediante IP y transferencia Western, cuatro líneas celulares se pre-aclararon dos veces, y las soluciones resultantes se inmunoprecipitaron con VB1-008. Como puede observarse en la Figura 10B, no se detectó ninguna banda en MCF-7, pero el resto de líneas celulares mostró las mismas 2 bandas específicas a ~50 kDa y ~110 kDa (débil). Además de estas, como puede observarse también en la Figura 10A, la inmunoprecipitación con 4B5 no dio como resultado ninguna proteína detectable con VB1-008, indicando la especificidad de la técnica de purificación utilizada. Los perfiles de unión de VB1-008 a estas siete líneas celulares medidos mediante citometría de flujo fueron comparables a los resultados observados en los experimentos de inmunopurificación (Tabla 8).

Ejemplo 7(b) Análisis 2D-PAGE

25 Para determinar los puntos isoeléctricos (Pi) y evaluar la posibilidad de apilado de proteínas en el análisis 1D-PAGE, los antígenos purificados de VB1-008 se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), donde la separación en la primera dimensión se realizó sobre la base del Pi y la segunda dimensión sobre la base del peso molecular. A continuación, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a un procesamiento por transferencia Western convencional. Puesto que las cantidades necesarias para la detección de proteínas en un gel 2D es ~4 veces mayor que las necesarias para un gel 1D, los antígenos purificados de 4 reacciones de inmunoprecipitación individuales se combinaron en un solo análisis 2D-PAGE. Se procesaron simultáneamente dos geles para su análisis por transferencia Western para garantizar que las proteínas detectadas en los geles teñidos con Coomassie eran las mismas que las observadas en las transferencias Western. Las transferencias Western 2D se sondearon con VB1-008 y se detectaron mediante ECI (quimioluminiscencia). Como puede observarse en la Figura 11A, se detectaron dos puntos a ~49 kDa /Pi = 5,2-5,6.

35 La Figura 11B representa el perfil de los inmunoprecipitados teñidos con Coomassie derivados de MDA-MB-435S separados mediante la electroforesis en gel bidimensional. Los dos puntos que se observaron, marcados como puntos "C" y "D" se recortaron para su análisis mediante EM. Los detalles de las proteínas identificadas se proporcionan en las Tablas 9A y 9B, respectivamente.

Extracción de péptido y análisis de proteína

45 Se utilizaron membranas A-375 y MDA-MB-435S para inmunopurificar antígeno(s) que se unieron a VB1-008. En condiciones de reductoras de separación del gel, se observó una banda de ~50 kDa en ambas líneas celulares y, en condiciones no reductoras, se observó la banda de ~110 kDa, denominada "E" a partir de células MDA-MB-435S. Estas bandas de proteína se recortaron de los geles teñidos con Coomassie y se enviaron para su análisis EM.

50 Las proteínas de la banda del gel 1D y las manchas del gel 2D se digirieron con tripsina para liberarlas del gel y se analizaron en un sistema CL-EM/EM de fase invertida. Las identidades de las proteínas se revelaron mediante análisis de la base de datos usando herramientas bioinformáticas. Los datos brutos incluyeron los péptidos obtenidos, y una lista de proteínas sugeridas incluyendo contaminantes como queratina. Para obtener el análisis, los espectros EM/EM se enviaron directamente a motores de búsqueda Mascot disponibles en www.Matrixscience.com.

Análisis de las masas del péptido y sus identidades

55 La relación entre el punto isoeléctrico (Pi) y el peso molecular de la posible proteína candidato es un parámetro principal para determinar la ID de la proteína. Se tuvo cuidado durante el análisis para garantizar que las masas peptídicas identificadas y sus Pi estaban comprendidas en un intervalo ± 3 kDa y $\pm 0,2$ Pi respectivamente. Esto es debido a la posibilidad inherente de que existan péptidos en diferentes estados modificados, dando como resultado su desviación de las masas teóricas calculadas y el Pi. Cualquier desviación aceptable no deberá superar los valores anteriormente especificados. En algunos casos, cuando el número de péptidos era muy bajo, se necesitó una etapa EM adicional para obtener más información mediante un proceso conocido como "secuenciación *de-novo*". La secuenciación *De-novo* es un proceso en el que una segunda etapa EM fragmenta cada uno de los péptidos obtenidos en el primer análisis EM para obtener fragmentos de iones de péptidos (iones y y b), que representa cada uno de ellos una forma ionizada de un aminoácido. La secuencia de cada péptido se puede entonces deducir del espectro de masas resultante.

Los péptidos tienen una tendencia general a experimentar modificaciones tales como la oxidación de las metioninas; esterificación de los grupos "R" ácidos, formaciones de acetamida de grupos amina e hidroxilaciones de restos prolina, hidroxiprolina y glicina durante las fragmentaciones EM/EM. Cuando estas modificaciones se producen, las masas peptídicas, aunque se perciban idénticas en los diferentes péptidos, dan como resultado un falso aumento en el modelo de puntuación de la ID de proteína, que por otra parte es una unidad acumulada de todos los péptidos individuales identificados. Si los péptidos no se analizan correctamente, pueden producir puntuaciones espurias que llevan a una identificación incorrecta de la proteína. Por tanto, era fundamental evaluar y seleccionar péptidos "únicos" que no fueran repetitivos o representados en otra parte, y otorgar correctamente las puntuaciones sobre la base de estos péptidos únicos. Además, algunos otros parámetros tales como la ventana SE, el número de escisiones incorrectas, fragmentación metaestable, modificaciones de aminoácido único, etc., se tomaron en cuenta antes del análisis final que se realizó en las propias instalaciones. Como consecuencia de estas etapas rigurosas, un importante número de péptidos se redujo drásticamente a un número inferior. La base de datos realiza la búsqueda usando estas listas editadas de proteínas cartografiadas desplegadas. Como el procedimiento empleado aquí es la inmunopurificación, la presencia de anticuerpo remanente también se consideró una contaminación junto con contaminantes bien conocidos tales como actina, vimentina, queratina, citoqueratina y tubulina. Las 3-4 proteínas resultantes finales eran ID legítimas, que se seleccionaron o eliminaron en función del Pi y los pesos moleculares de las proteínas deducidos mediante 2D-PAGE.

Análisis de puntos "C" 2D

El punto "C" recortado del gel 2D identificó solamente alfa-fetoproteína (AFP), mientras que las otras dos proteínas relacionadas eran inhibidores de la proteasa añadidos para mantener la integridad de la proteína durante el estudio. El Pi también corresponde la posibilidad de que la molécula sea AFP. El análisis EM reveló 65 péptidos, pero solamente se recuperaron 30 péptidos únicos que constituye el 54 % de cobertura de secuencia para AFP humano, mostrando cada péptido un 100 % de homología respecto a la proteína original. Sin embargo, la molécula AFP carece de los primeros 160 aa desde el extremo N. El análisis de secuencia de la molécula AFP humana mostró la presencia clara de restos arginina y lisina en estos primeros 106 aa, que se podrían escindir como péptidos, si estuvieran presente en la molécula. La información de la secuenciación *de-novo* de la mancha 2D "C", mostró una falta de 160 aa del extremo N, lo que ha sido un fenómeno recurrente cuando se estableció la identidad de AFP (Figura 12A). Los resultados combinados de la secuenciación *de-novo* del gel 1 D y del gel 2D se muestran en la Figura 12B. Los resultados muestran una falta de 106 aa del extremo N. La Tabla 11A lista los péptidos identificados.

Análisis de puntos "D" 2D

El punto "D" del gel 2D reveló las identidades de 3 proteínas además de los contaminantes que se purificaron simultáneamente, actina y proteína de unión a actina. Sin embargo, salvo para CD44, los Pi de las otras dos proteínas fueron marcadamente distintas de la observada para el punto 2D, por tanto fueron excluidas con ID de proteínas. Se determinó que peso molecular de la isoforma 3 de CD44 era de $53,585 \pm 3$ kDa, lo que la convierte en un emparejamiento completo para el peso molecular y el Pi observado en el análisis mediante 2D-PAGE del punto "D".

Análisis de la banda de antígeno de 110 kDa

Tal como se ha mencionado anteriormente, en condiciones reductoras, la banda a ~110 kDa se visualizó tanto mediante Coomassie como mediante el análisis por transferencia Western. Del análisis 2D-PAGE, fue evidente que había dos componentes, cada uno de ellos alrededor de ~50 kDa, identificado individualmente como CD44 y AFP, contribuyendo conjuntamente para formar una banda de 110 kDa cuando la conformación se conservó en condiciones no reductoras de la separación del gel. De esta forma, para confirmación, la banda a 110 kDa se recortó y se analizó para identificar los componentes de la proteína. La banda a 110 kDa observada en la Figura 13A, se recortó (E) para análisis EM. Los detalles de las proteínas identificadas a partir de la banda a 100 kDa se proporcionan en la Tabla 10.

Análisis EM de la banda "E" de la proteína

Los resultados del análisis EM de la banda "E" de la proteína se proporcionan en la Tabla 10. Además de los contaminantes que se purifican conjuntamente, es decir, actina, actinina y vimentina, se obtuvieron tres identidades de proteína. Entre ellas se encontraba CD44, AFP y la proteína de choque térmico 90. La proteína de choque térmico 90 no era un emparejamiento para el peso molecular identificado, y por tanto quedó excluida como candidato potencial. Puesto que CD44 está asociada a la membrana, se trata probablemente del antígeno análogo. Se ha demostrado que AFP se purifica simultáneamente con CD44 (Figura 15A), sin embargo, AFP no se detectó sobre la membrana superficial.

Usando un enfoque proteómico descendente, fue evidente que el peso molecular del antígeno aislado (50 kDa) correspondió al peso molecular previsto para CD44E. Los experimentos de flujo y la ordenación de la unión con respecto a las líneas celulares analizadas validan también este hallazgo. Los datos de las Tablas 11B y 12 describen

los datos asociados con la cartografía de los péptidos identificados mediante análisis EM/EM. Específicamente, se aisló un conjunto de 8 péptidos que cartografiaron hacia 3 regiones diferentes de la molécula CD44. En concreto, un péptido cartografió una región v8-v9 que es única con respecto a CD44E además de estar presente en la molécula precursora.

La Figura 14 representa la cobertura de la secuencia obtenida del cartografiado de los péptidos obtenidos en la base de datos de proteínas. Se obtuvo un conjunto de 8 péptidos en toda la cartografía de la región extracelular, uno en la región variable y 4 en la región citoplásmica de la molécula CD44. La investigación de homologías y el cartografiado de péptidos de las variantes de CD44E indican que CD44R1 y CD44 R2 también expresan los exones v8-v10 en la región variable. Sin embargo, carecen de una parte importante de la cola citoplasmática del exón 19. Por tanto, solo 4 péptidos de los 8 identificados en el análisis de los inventores mostraron homología, por lo tanto no encajan en el criterio de peso molecular/Pi observado a partir del antígeno purificado mediante inmunoprecipitación. El peso molecular previsto de 53,8 kDa para CD44E y el peso molecular y Pi observados demuestran ser una correspondencia exacta. Por tanto, la isoforma CD44 que es el posible antígeno de VB1-008 es CD44E o la forma epitelial, también denominada como isoforma-3.

Ejemplo 7(c) Validación del antígeno VB1-008

(1) Reactividad de la superficie celular de anti-CD44 y anti-AFP mediante citometría de flujo

La posibilidad de que CD44 sea el antígeno análogo de VB1-008 se ha establecido claramente mediante inmunoprecipitación, análisis basados en gel y análisis EM. Se han utilizado preparaciones de membrana en todos los estudios realizados con VB1-008 basándose en los experimentos de caracterización preliminares que sugieren claramente la localización en la membrana del antígeno que se une a VB1-008. Para determinar la orientación de los dos componentes del antígeno en la superficie celular, se midió la reactividad mediante citometría de flujo sobre un panel de líneas celulares, con VB1-008, anti-CD44, anti-AFP y anti-EGFR. También se utilizaron en el estudio los controles emparejados por isotipo adecuados.

Se seleccionó un panel de líneas celulares que expresaban niveles diferentes de VB1-008 Ag para realizar experimentos comparativos de reactividad en la superficie celular. Aproximadamente, se utilizaron 300.000 células de cada línea celular, y se midió el número de veces de aumento en la fluorescencia media de VB1-008/anti-CD44/anti-AFP, que se comparó con los correspondientes controles emparejados según isotipo. La columna de la intensidad del antígeno fue una compilación de la intensidad de la señal observada mediante el análisis WB de cada línea celular, sondeada con los correspondientes anticuerpos. El control emparejado por isotipo de VB1-008 fue 4B5-IgG y el control de anti-CD44, antiAFP y anti-EGFR fue una IgG de ratón, puesto que los tres últimos anticuerpos eran anticuerpos monoclonales de ratón.

como se muestra en la Tabla 13, la ordenación del enlace de anti-CD44 fue similar a VB1-008. Anti-AFP no mostró ninguna unión detectable respecto al control emparejado por isotipo. Como anti-CD44 y anti-AFP eran anticuerpos monoclonales de ratón, se usó anti-EGFR, un anticuerpo monoclonal, como control positivo. No solo la ordenación de la unión fue comparable, anti-CD44 mostró un importante aumento de más de 48 veces en comparación con la unión de VB1-008, lo que sugiere la presencia de una interacción antígeno análogo-anticuerpo. La intensidad del antígeno observada en los perfiles de transferencia también fue comparable con la del perfil obtenido mediante el flujo.

(2) Análisis 1D-PAGE/Transferencia Western de AFP recombinante

AFP es una glicoproteína sérica que está comercialmente disponible en forma de una molécula recombinante de 67 kDa. Esta molécula se compró a RDI laboratories y 0,3 µg de la proteína pura, AFP y 0,3 µg de BSA se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondeó con VB1-008. Como puede observarse en la Figura 15A, se observó una reactividad positiva que indica la presencia de un epítipo de AFP reconocido por VB1-008. Como AFP era una de las dos moléculas de proteína purificadas mediante inmunoprecipitación con VB1-008 e identificada mediante análisis EM, el experimento actual de transferencia de western demuestra la presencia de AFP en la muestra inmunopurificada mediante VB1-008.

(3) Análisis de transferencia Western de VB1-008 Ag y reactividad con anti-AFP y anti-CD44

La separación 2D-PAGE de los eluatos de la reacción de inmunoprecipitación con VB1-008 de las membranas MDA-MB-435S reveló la presencia de dos puntos diferentes, "C" y "D", en el intervalo de Pi de 5,1-5,4 y un peso molecular de 51±3 kDa, e intervalo de Pi 5,2-5,5 y 50±3 kDa respectivamente. Los dos puntos se visualizaron también al sondear con VB1-008. El análisis CL-EM/EM de estas dos manchas reveló las identidades de AFP y CD44, cuya presencia se confirmó incluso en la banda de 110 kDa observada en condiciones no reductoras. Por tanto, como siguiente etapa, se repitieron las mismas condiciones de inmunoprecipitación, se resolvió en 2D-PAGE, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y las transferencias Western se sondearon con anti-AFP y anti-CD44. Los resultados se muestran en la Figura 15B y la Figura 15B.

Cada uno de los anticuerpos comercialmente disponibles, anti-AFP y anti-CD44 reaccionó específicamente con las manchas análogas identificadas mediante análisis EM en las Figuras 11A y 11B como puntos "C" y "D" respectivamente. En la Figura 15B y C, se observaron dos puntos alrededor del mismo Pi, que difieren en 2-3 kDa interactuando con anti-CD44, posiblemente debido a cierta pérdida aleatoria de unos pocos aminoácidos como subproducto de procesamiento o debido a la sensibilidad de anti-CD44 para reconocer la presencia de epítopos CD44 circundantes. El punto que se debe resaltar es que los dos puntos han reaccionado con VB1-008, identificados como AFP y CD44 se han visualizado con los respectivos anticuerpos en las posiciones adecuadas de masa y Pi.

(4) Reactividad cruzada de AFP respecto a CD44

Para comprender las relaciones entre AFP y CD44, se diseñó un experimento para inmunoprecipitar todas las isoformas de CD44, usando anti-CD44. Estas proteínas purificadas selectivamente se sometieron a SDS-PAGE y WB. Se llevaron a cabo simultáneamente tres conjuntos de experimentos idénticos. Las transferencias Western se sondearon con anti-CD44.

Como puede observarse en la Figura 16, AFP reacciona muy intensamente con CD44 en el intervalo de 115-200 kDa cuando se sometió a experimentación en condiciones no reductoras. VB1-008 reacciona con CD44 como se esperaba, y se observa como una banda individual clara en el intervalo de ~110 kDa como se ha observado en los casos anteriores. Por tanto, es posible que AFP sea otra proteína purificada simultáneamente que tiene la capacidad inherente de interactuar con CD44. Como resultado de unirse a CD44, queda desplegada cuando se inmunopurifica con VB1-008.

DISCUSIÓN

Los experimentos de inmunopurificación con VB1-008 mostró una banda individual específica a ~110 kDa en condiciones no reductoras en un banda individual de 50+3 kDa en condiciones reductoras de 1 D-PAGE. Para resolver las posibilidades de apilamiento de proteínas y determinar el punto isoelectrónico de la proteína, se realizó el análisis 2D-PAGE. Los resultados del análisis 2D-PAGE mostraron la presencia de dos puntos en Pi = 5,1-5,4 y 5,2-5,5 con pesos moleculares de 51±3 kDa y 50±3 kDa, respectivamente. El análisis EM/EM de los puntos 2D recuperó 32 y 8 péptidos, que se extendían un 54 % y un 28 % de cada proteína identificada, respectivamente. Los dos posibles antígenos identificados fueron la isoforma 3 de CD44 y una forma de alfa-fetoproteína de bajo peso molecular.

Los experimentos de validación se realizaron para confirmar la presencia de los antígenos sugeridos. El análisis SDS-PAGE/transferencia Western de la molécula de AFP recombinante sondeado con VB1-008 mostró una reactividad positiva en el intervalo de 67 kDa como una banda individual intensa, confirmando de esta forma la presencia de AFP. Para confirmar la presencia de CD44, se ensayó el mismo panel de células usando citometría de flujo con anti-CD44. CD44 mostró un aumento importante en la unión, comparado con VB1-008, conservando también la misma ordenación. AFP no consiguió unirse a ninguna de las líneas celulares ensayadas. Estos resultados sugieren que CD44 es el antígeno de la superficie celular que es reconocido por VB1-008. También, la inmunopurificación y posterior análisis EM/EM claramente indica la implicación de AFP.

CD44E como el VB1-008 Ag

Se realizó la identificación de la proteína con mediciones de m/z de péptidos tripticos derivados de VB1-008 Ag purificada mediante inmunoprecipitación. A través de búsquedas en bases de datos de proteínas se consiguió una diana perfecta que correspondía a un conjunto de 8 péptidos identificados a partir de VB1-008 Ag inmunopurificado, que apunta a una isoforma 3 de CD44 también conocida como CD44E o la forma epitelial. El peso molecular del antígeno purificado descarta la posibilidad de ambas isoformas (1 y 2) como el antígeno reconocido por VB1-008 en las líneas celulares. Otras isoformas como la isoforma 2 que codifica todos los exones salvo v1 o CD44v3, 8-10 también podría esperarse una reacción con VB1-008 pero su peso molecular y/o Pi no son consistentes con los observados para el antígeno de la superficie celular de VB1-0080.

Los inventores han mostrado evidencias de la aparición del peso molecular previsto de CD44E o la isoforma 3 como 50±3 kDa tanto en 2D-PAGE, sondeado con anti-CD44 como en 1 D-PAGE en condiciones reductoras de preparación de la muestra, que en condiciones no reductoras se observó como 110±10 kDa en 1 D-PAGE y análisis de transferencia Western. El análisis CL-EM/análisis de las proteínas confirmó la presencia de CD44E.

Ejemplo 8: Cartografiado de epítipo - Experimentos de unión

Tal como se ha descrito anteriormente, la inmunoprecipitación y el análisis EM han identificado CD44E (isoforma 3) como el antígeno VB1-008. CD44E se diferencia de otras variantes de corte y empalme por tener exones v8-v10 entre las secuencias conservadas, exones 1-5 y 16-20. Los péptidos se sintetizaron a continuación a partir de la región única de CD44E (es decir, la secuencia de aminoácidos que expande la unión del exón 5-v8) para identificar el epítipo reactivo de VB1-008. Se utilizó un péptido de la misma longitud obtenido de la región del extremo C de

CD44E como control negativo.

MÉTODOS Y REACTIVOS

5 Péptidos de la región única de CD44E:

Los péptidos sintéticos que amplían la unión del exón 5-V8 de CD44E se solicitaron a Global peptide services, LLC. La secuencia de aminoácidos (17 aa) de CD44E amplía una longitud de 6 aminoácidos desde el exón 5 y 11 aminoácidos desde el péptido único de la región v8. La parte destacada de la Figura 18A representa el tramo de 17 aminoácidos que se ha dividido en 3 péptidos, y la secuencia del péptido de control negativo es como se resalta en la región del extremo C de la proteína.

La secuencia de aminoácidos de cada péptido es la siguiente:

15 Péptido 1: Biotina-STDRIPATNMD -1445.2 amu (SEC ID N°: 26)
 Péptido 2: Biotina-RIPATNMDSSH -1453.27 amu (SEC ID N°: 27)
 Péptido 3: Biotina-ATNMDSSHSIT -1387.58 amu (SEC ID N°: 28)
 Negativo: Biotina-AVEDRKPSGLN -1410.19 amu (SEC ID N°: 29)

20 Péptidos solubilizantes:

Todos los péptidos se solubilizaron en PBS. El pH de la solución se ajustó con HCl 0,01 N o con NaOH 0,01 N si se observa alguna dificultad en la solubilidad. El péptido se almacenó en soluciones de almacenamiento (1000 nM) a -20 °C.

25 Revestimiento de los péptidos en una placa ELISA:

Las soluciones de péptido se diluyeron 1 a 100 con suero salino tamponado de Hank (HBSS) que contenía formaldehído al 0,5 %. 100 µl de solución de péptido diluido se distribuyó a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El sobrenadante se eliminó, y las placas se dejaron destapadas dentro de una incubadora a 37 °C durante 16-18 horas. Las placas revestidas de péptido se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 2-8 °C hasta que fueron necesarias.

35 Como alternativa, los péptidos se diluyeron en tampón carbonato/bicarbonato a pH 9,6 y se vertieron sobre las placas. El resto de las etapas, con la excepción de un cambio en el tampón de revestimiento, fueron análogas.

Unión de VB1-008 a las placas ELISA revestidas con péptido:

La unión de VB1-008 a los péptidos inmovilizados se realizó de acuerdo con SOP 2.1.19 y SOP 2.2.7:

40 Tras la incubación durante la noche de las placas revestidas con péptido, 300 µl de tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,5 %) se añadieron manualmente a cada placa mediante una pipeta de repetición provista de un adaptador de 8 canales. El contenido de las placas se descartó; las placas se invirtieron y se dejaron sobre 3-4 pulgadas (7,6-10,1 cm) de papel secante para eliminar el exceso de líquido. Las etapas anteriores se repitieron dos veces más.

Bloqueo:

50 Las placas revestidas con péptido se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS que contenía BSA al 1 %). Las placas se incubaron durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se descartó después de la incubación.

Unión:

55 Se añadieron alícuotas equivalentes a 75 µg/ml de VB1-008 a cada uno de los pocillos y se incubaron a 37 °C durante dos horas. Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente con el tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,5 %). Las placas se incubaron con una dilución 1:6000 de anticuerpo dirigido contra IgG humana-HRP durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente. 100 µl de sustrato TMB (sustrato TMB peroxidasa KPL n° cat. 50-76-00) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 5-10 minutos en la oscuridad. La reacción se finalizó por adición de 100 µl de ácido fosfórico 1 M a cada pocillo. La densidad óptica se midió a 450 nm usando un lector de placas ELISA.

65 Como alternativa, Las placas ELISA se revistieron con 100 µg/ml de VB1-008, de acuerdo con SOP 2.1.111, y la unión de los péptidos biotinilados a VB1-008 se ensayó de acuerdo con SOP 2.1.41 para la detección de las sondas biotiniladas.

RESULTADOS

El cribado de los péptidos sintéticos a partir de la región única de CD44E (es decir, la secuencia de aminoácidos que expande la unión del exón 5-v8), reveló que el Péptido 3 mostró la unión más fuerte, seguido del péptido 2 que demostró un 50-60 % de la unión observada con el Péptido 3. Un péptido de la misma longitud tomado de la región del extremo C de CD44E usado como control negativo no mostró ninguna reactividad, como fue el caso del Péptido 1. La reactividad de VB1-008 con el péptido 3 demostró que esta región de CD44E contiene el epítipo reactivo de VB1-008. Véase la Figura 18B.

Ejemplo 9: Cartografiado de epítipo - Experimentos de competición

Se ensayó a continuación la eficacia de competición de los péptidos para su unión a VB1-008.

MÉTODOS Y REACTIVOS**Crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares tumorales:**

Las líneas celulares que son positivas para VB1-008, es decir, MDA-MB-435S se cultivaron y mantuvieron de acuerdo con las directrices de la ATCC.

Péptidos sintéticos:

Todos los péptidos se solubilizaron en PBS y se almacenaron a 1,428 mM (2 mg/ml) y en forma de soluciones 100 μ M a -20 °C.

Ensayo de competición:

VB1-008 (75 μ g/ml) -concentración 0,5 μ M se utilizó como el control no competitivo. Excesos molares, es decir, 20X, 40X, 100X y 200X, de los péptidos se utilizaron para competir con VB1-008. Las mezclas péptidos/VB1-008 se incubaron sobre hielo durante 10 minutos antes de unirse por flujo. Se utilizó 4B5-IgG como el control emparejado por isotipo y se usó anti-EGFR como el anticuerpo no relacionado. Estos dos anticuerpos se procesaron exactamente de la misma forma que VB1-008.

Unión de VB1-008:

La unión de VB1-008, junto con la de los anticuerpos anti-EGFR y 4B5-IgG a las células MDA-MB435S se evaluó mediante citometría de flujo; y se realizó de acuerdo con el protocolo optimizado anteriormente descrito. Las células tratadas con péptidos y las que no se trataron se procesaron de forma similar.

RESULTADOS

Como puede observarse en la Figura 19A, el péptido 1 no compite con VB1-008 por la unión a MDA-MB435S, el péptido 2 compite con una eficacia del 60 % con VB1-008 por la unión a MDA-MB435S y el péptido 3 compite con una eficacia del 96 % con VB1-008 por la unión a MDA-MB435S. El control no mostró competición con VB1-008.

La Figura 19B muestra los resultados del control emparejado por isotipo. Ninguno de los péptidos o controles compitió con anti-EGFR por la unión.

Ejemplo 10: Citotoxicidad de la inmunotoxina VB1-008**MÉTODOS Y REACTIVOS**

La construcción VB6-008, que comprende VB1-008 unida a una bouganina modificada se construyó usando los métodos descritos en los documentos WO 2005/090579 y US 2005/0238642.

Se generó una unidad de expresión dicistrónica que comprende el dominio VH-CH de VB1-008 unido a una bouganina modificada usando un enlazador sensible a furina seguido inmediatamente por el dominio VL-CL de VB1-008. Ambas VH y VL iban precedidas de una secuencia líder Pe1B (véanse las Figuras 26 y 27). La unidad dicistrónica se clona en el vector pING3302 Xoma vector que estaba bajo el control del promotor araBAD inducible por arabinosa. La presencia de la secuencia líder Pe1B, adyacente a VH-CH Bouganina y VL-CL, dará como resultado la secreción de las proteínas en el espacio periplásmico, donde el ambiente reductor permitirá la formación del puente disulfuro entre los dos dominios constantes. Finalmente, la proteína de fusión Fab-bouganina se secretará al sobrenadante del cultivo. Una marcada afinidad de histidina, colocada en el extremo N de VL-CL permite que la proteína Fab-bouganina se purifique usando un método de captura de quelación con Ni²⁺. El fragmento VH de VB6-008 (395 pb) se amplificó con los siguientes cebadores, y se clonó en el casete Pe1B-VB6-011-F-boug gamma usando los sitios de restricción PvuII y NheI.

5' PvuII-QVQL

5' ATG GCG CAG GTG CAG CTG CAG GAG TTG GGT CCA (SEC ID N°: 30)

3' VB4-008-NheI

5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC GCT AGC GAC AGT GAC CAT TGT CCC (SEC ID N°: 31)

5 La cadena ligera VB1-008 es una lambda y puesto que el dominio lambda CL contiene un sitio de restricción SpeI, se utilizó un sitio de restricción diferente para ensamblar VB6-008. Por tanto, en el extremo 5' del fragmento de cadena ligera de VB6-008, el sitio de restricción HindIII (en la bouganina) se utilizó para ensamblar la construcción final en el plásmido pSP73 (Véase la Figura 27). No se encontró ningún sitio de restricción alrededor de la unión de VL-CL, por tanto el VL-CL de cada clon se obtuvo mediante un enfoque de extensión mediante PCR con solapamiento por corte y empalme. Se usaron los siguientes cebadores junto con D-bouganina 156, la señal PelB y el ADNc del hibridoma VB1-008 como moldes:

15 HindIII-boug-PelB-VB6-008 lambda se ensambló por extensión de cadena mediante polimerasa con solapamiento por corte y empalme
El método de reacción utiliza los siguientes cebadores:

5' Furina enlazador D-bouganina

20 5' CAC AGG CAG CCC AGA GGC TGG GAG CAG CTC TAC AAC ACC GTG TCA TTT AAC CTT (SEC ID N°: 32) 3'008-PelB

5' CGT TCC ATA GAC CTG CAG TCT AGA GTC GAC TCA CTA TTT GGA GCT TTT AAA CTT (SEC ID N°: 33)

25 5' PelB-Sall

5' AAG TTT AAA AGC TCC AAA TAG TGA TCT AGA GTC GAC CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT (SEC ID N°: 34)

3' 008-VL CL

5' CAC TGA GGG TGG CTG AGT CAG CTC ATA GTG ATG GTG GTA GTG AGT (SEC ID N°: 35)

30 5' 008-VL CL

5' CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAT GAG CTG ACT CAG CCA CCC TCA GTG (SEC ID N°: 36)

3' 008 CL STOP

5' CTC GAG TCA CTA TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TGT CTT CTC CAC (SEC ID N°: 37)

35 Se llevó a cabo un enfoque de extensión mediante PCR con solapamiento por corte y empalme usando los 6 cebadores listados anteriormente para su amplificación.

Paso 1

40 Se usaron los cebadores 1 y 2 para amplificar la bouganina que contenía una parte del promotor PelB (820 pb) en el extremo 3'. En una segunda reacción de la PCR, se usaron los cebadores 3 y 4 para amplificar el PelB que contenía en el extremo 3' una etiqueta His y una parte de VB6-008 VL (179 pb). En una tercera reacción de la PCR, se usaron los cebadores 5 y 6 para amplificar la cadena lambda de VB6-008 con dos codones de detención en el sitio XhoI (666 pb) en el extremo 3'.

45 Paso 2

50 En la segunda reacción de la PCR, se usaron los cebadores 1 y 6 con 1 µl de cada producto de la PCR para producir una cadena lambda HindIII-bouganina-PelB-VB6-008 (1591 pb).

Se usó la electroforesis en un gel de agarosa al 1 % para separar los productos amplificados mediante PCR. Las bandas de interés se recortaron y se purificaron con un kit de extracción Qiaquick, se clonaron en el vector de clonación TOPO pCR 2.1 y se secuenciaron con un secuenciador 373 DNA.

55 El producto de la PCR se purificó y se secuenció. Un clon verificado se digirió con HindIII y XhoI y se ligó en el PelB-VB4-008-F-boug/pSP73 previamente digerido con las correspondientes enzimas (Figura 27). El fragmento VB6-008 se digirió a continuación con EcoRI y XhoI y se clonó en el vector de expresión pING3302 y se transformó en células E104.

60 Las células E104 se propagaron en 30 ml de medio TB (inóculo al 1 %) en un frasco de agitación a 250 ml a 37 °C, se agitó a 225 rpm durante aproximadamente 5 horas hasta que la densidad óptica (D.O. 600 nm) alcanzó 2. En ese momento, el cultivo se indujo con una concentración final de L-(+) arabinosa al 0,1 % durante 16 horas y se incubó a 25 °C. A continuación, el aglomerado celular y el sobrenadante se recogieron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos. Tanto el aglomerado celular como el sobrenadante se analizaron mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-His (Amersham Biosciences 27-4710-01) y un anticuerpo dirigido contra la cadena ligera kappa humana (Sigma A-7164) o un anticuerpo dirigido contra la cadena ligera lambda humana (Sigma A-5175) en

condiciones reductoras y no reductoras para confirmar la presencia y el tamaño de la inmunotoxina. Se realizó una investigación en Cell Bank del clon con el mayor nivel de expresión, y tres viales independientes se sometieron a ensayo para su inducción a una escala de 500 ml de TB en frascos de agitación de 2 l. Cada 6 horas, el aglomerado celular y el sobrenadante se aislaron y se utilizó el análisis mediante transferencia Western para indicar el tiempo de post-inducción óptimo para la recolección.

Se utilizó la citometría de flujo para demostrar que las inmunotoxinas VB6 purificadas retienen la especificidad de unión de su respectivo anticuerpo precursor usando líneas celulares positivas y negativas para el antígeno. La unión se detectará usando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra His (Amersham Biosciences 27-4710-01). La especificidad de la unión se evaluó mediante un ensayo de competición. En resumen, la inmunotoxina VB6 (a una concentración fija) y el correspondiente anticuerpo VB1 o un anticuerpo control emparejado por isotipo (en concentraciones variables) se incubó simultáneamente con células positivas para el antígeno. La unión se detectó usando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra His. La disminución en la unión usando el anticuerpo monoclonal dirigido contra His indicó que las inmunotoxinas VB6 y el correspondiente anticuerpo VB1 se unen al mismo antígeno. Se espera que el nivel de unión de las inmunotoxinas VB6 no se verán alteradas en presencia del anticuerpo control emparejado por isotipo. La afinidad funcional de las inmunotoxinas VB6 se calculó con una curva de valoración usando una línea celular positiva para el antígeno. Se usó un ensayo MTS para medir el valor de la CI_{50} de cada inmunotoxina VB6 usando líneas celulares positivas y negativas para el antígeno. VB6-4B5 se usó como control negativo. La especificidad de la citotoxicidad se midió mediante la diferencia en el valor de la CI_{50} entre las VB6 y VB6-4B5.

RESULTADOS

Se construyó un inmunoconjugado (VB6-008) que comprende VB1-008 unido a una bouganina modificada. La secuencia de nucleótidos del inmunoconjugado se representa gráficamente en la Figura 20 (SEC ID). La secuencia de aminoácidos del inmunoconjugado se representa gráficamente en la Figura 21 (SEC ID). La Figura 22 muestra la construcción VB6-080 completa. La Figura 23 muestra la unidad VB6-008 nº 1, que incluye PeIB-VH-CH-Furina-De-Bouganin. La Figura 24 muestra la unidad VB6-008 nº 2, que consiste en PeIB-VL-CL.

La citotoxicidad de VB6-008 se evaluó *in vitro* contra las células positivas para el antígeno, MB-435SC. Colo-320 se usó como control negativo. Las células se incubaron con VB8-008 comprendido de 1000 a 1 nm y después de 5 días de incubación se midió la variabilidad. Como se puede observar en la Figura 25, el inmunoconjugado VB6-008 destruyó significativamente las células positivas para el antígeno en comparación con el control negativo.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que actualmente se consideran los ejemplos preferidos, debe entenderse que la invención no se limita a los ejemplos divulgados. Por el contrario, se pretende que la invención cubra varias modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Tabla 1: Secuencias CDR

Secuencias CDR				
VB1-008				
	Cadena L		Cadena H	
CDR1	SGDNLGNKYVC	SEC ID	GDEYYWS	SEC ID
CDR2	EDTKRPS	SEC ID Nº: 2	YMSYRGSSYSPSLQS	SEC ID Nº: 5
CDR3	QAWDSRTEI	SEC ID	KYCGGDCRSGFDI	SEC ID

Tabla 2: Comparación entre la unión a la superficie en células normales y tumorales con VB1-008

Ubicación clínica	Líneas celulares tumorales representativas	N1	MF2	Orden relativo
Mama	MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435S	3	17,2	1
Pulmón	A-549, NCI-H460, NCI-H69	3	16,1	2
Melanoma	A-375, SK-MEL-5 ^{a,b} , SK-MEL-28 ^a	3	15,6	3
Próstata	DU-145 ^{a,b,t} , PC-3 ^{a,b,g} , LNC ^a P ^{a,b,g}	3	14,2	4
Ovario	SK-OV-3 ^a , OVCAR-3	2	10,8	5
Riñón	Caki-1 ^a , A498 ^a , ACHN ^a	3	10,5	6
Hígado	SK-HEP-1, Hep-G2	2	8,3	7

Recto	SW837, NCI-H630	2	7,5	8
Colon	HT-29a, SW480, WiDr	3	7,2	9
Cuello de útero	HeLa, C-41, C-33A	3	4,4	10
Estómago	AGS, NCI-N-87, KATO III	3	4,0	11
Vejiga	UM-UC-3, T24	2	3,9	12
Endometrio	RL-95-2, HEC-1-A	2	3,9	12
Páncreas	PANC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2	3	3,8	14
Cabeza y cuello	SCC-15, SCC-25	2	2,9	15
Tipo celular normal	Línea celular			Tumor normal
Riñón	HRE	1	6,1	1,7
Pulmón	NHLF	1	5,6	2,9
Endotelial	HUVEC	1	1,6	N/A
Mama	HMEC	1	2,4	7,2
Próstata	PrEC	1	4,0	3,6

¹N indica el número de líneas celulares sometidas a ensayo por indicación. 2MF: Los valores indican la media calculada a partir de la suma del incremento promedio, en número de veces, de la fluorescencia media comparado en anticuerpo de control para todas las líneas celulares de cada indicación. Un valor cero indica que no hay reactividad mensurable con respecto al anticuerpo de control. a indica modelos ortotópicos ofrecidos por AntiCancer Inc. b Indica líneas celulares disponibles como transfectantes de GFP (proteína fluorescente verde). ^cHer2/neu⁺,ER⁺. ^dHer2/neu⁻,ER⁻, p53^{mt}, ras^{wt}. ^eHer2/neu⁺,ER⁻, p53^{mt}, ras^{wt}. ^fsensible a andrógenos. ^gno sensible a andrógenos. N/A, no aplicable. Se utiliza el aumento promedio en el número de veces (MF) para calcular el cociente entre células tumorales y normales.

Tabla 3: Matriz LD de tejido crítico normal para VB1-008

Tejido	Tinción de membrana	Intervalo de puntuación*
Cerebro	Ninguno (0/2)	0
Colon	Ninguno (0/5)	0
Corazón	Ninguno (0/5)	0
Riñón	2/3	0-1 (10 %)
Hígado	Ninguno (0/5)	0
Pulmón	Ninguno (0/5)	0
Páncreas	1/5	1 (30 %)
Estómago	1/5	1 (70 %)

* La puntuación se evaluó en una escala 0-3⁺, donde 0 = sin tinción y la traza es inferior a 1⁺ pero mayor de 0. Los grados 1⁺ a 3⁺ representan intensidad creciente de tinción, donde 3⁺ es una tinción intensa de color verde oscuro. En general, se cribó un único espécimen de 6 pacientes diferentes. Donde se han cribado menos de 6 pacientes, esto indica que bien se han perdido las puntuaciones o bien no son representativas del tejido a teñir. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de células teñidas en el intervalo puntuado.

Tabla 4: HD Normal TMA para VB1-008

Tejido	Tinción de membrana	Intervalo de puntuación
Suprarrenal	Ninguno (0/2)	0
Aorta	Ninguno (0/5)	0

ES 2 535 229 T3

Arteria	Ninguno (0/5)	0
Vejiga	Ninguno (0/5)	0
Cerebro	Ninguno (0/5)	0
Mama	Ninguno (0/5)	0
Trompa de Falopio	3/4	1-2 (30-60 %)
LN	Ninguno (0/3)	0
Músculo	Ninguno (0/4)	0
Ovario	Ninguno (0/5)	0
Pituitaria	Ninguno (0/5)	0
Placenta	Ninguno (0/4)	0
Próstata	4/5	0-1 (10-20 %)
Piel	ND	
Espina dorsal	Ninguno (0/1)	0
Bazo	Ninguno (0/2)	0
Testículos	3/5	1-2 (95 %)
Timo	Ninguno (0/1)	0
Tiroides	Ninguno (0/5)	0
Uréter	1/2	
Útero	Ninguno (0/5)	0
* La puntuación se evaluó en una escala 0-3 ⁺ , donde 0 = sin tinción y la traza es inferior a 1 ⁺ pero mayor de 0. Los grados 1 ⁺ a 3 ⁺ representan intensidad creciente de tinción, donde 3 ⁺ es una tinción intensa de color verde oscuro. En general, se cribaron 2 especímenes de 8 pacientes diferentes. Donde se han cribado menos de 8 pacientes, esto indica que bien se han perdido las puntuaciones o bien no son representativas del tejido a teñir. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de células teñidas en el intervalo puntuado.		

Tabla 5: HD Tumor TMA para V81-008

Tejido	Tinción de membrana	Intervalo de puntuación*
Vejiga	6/6	1-2 (100 %)
Mama	6/7	1-2 (100 %)
Cuello de útero	2/7	1 (100 %)
Colon	3/3	1-2 (100 %)
Riñón	5/8	1-2 (100 %)
Hígado	5/7	1-2 (100 %)
Pulmón	1/8	1 (100 %)
Ovario	6/7	1-2 (100 %)
Páncreas	4/7	1 (100 %)
Próstata	5/5	1-2 (100 %)
Recto	4/6	1-2 (100 %)
Piel	1/4	1 (100 %)
Estómago	4/5	1-2 (100 %)

Útero	8/8	1-2 (100 %)
Cabeza y cuello	4/8	1 (100 %)
<p>* La puntuación se evaluó en una escala 0-3⁺, donde 0 = sin tinción y la traza es inferior a 1⁺ pero mayor de 0. Los grados 1⁺ a 3⁺ representan intensidad creciente de tinción, donde 3⁺ es una tinción intensa de color verde oscuro. En general, se cribaron 2 especímenes de 8 proteínas diferentes. Donde se han cribado menos de 8 proteínas, esto indica que bien se han perdido las puntuaciones o bien no son representativas del tejido a teñir. Los cánceres de cabeza y cuello incluyen carcinomas de garganta, labio, laringe, boca, amígdalas, y superficie gingival. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de células teñidas en el intervalo puntuado.</p>		

Tabla 6: La evaluación mediante citometría de flujo de la unión del anticuerpo en función del tiempo y la temperatura

MAb ID	Anticuerpos ¹	Tiempo de incubación (min) a 37 °C	Fluorescencia media (MF)	Veces de aumento en MF ²	% Reducción en MF ³
VB1-008	17P2/C12	-4	134,0 ± 11	31,7	-
		60	57,0 ± 1,0	13,5	57,5
		120	50,7 ± 1,1	12,0	62,2
No internalizante Control	MA-103	-	536,1 ± 31,3	112,8	-
		120	535,5 ± 16,8	113,0	-
Intenalizante Control	5E9	-	246 ± 11	60,0	-
		60	53,5 ± 1,5	13,0	78,3
		120	48 ± 4	11,7	80,5

¹A Se muestra un experimento representativo. ²MF aumento por encima del control negativo, IgG de mieloma de ratón o IgG humana (4B5). ³Reducción porcentual de MF en la superficie celular de células tumorales. ⁴(-) células incubadas sobre hielo durante 120 minutos.

5 **Tabla 7: Aumento en la fluorescente promedio para V81-008 sobre un control emparejado por isotipo para cada línea celular usada en el estudio**

Línea celular	MF*
A-375	13,3
MDA-MB-435S	15,8
MDA-MB-231	14,2
MCF-7	4,67
PANC-1	8,3
DAUDI	1,1
RAMOS	1,3

Tabla 8: resumen de los antígenos purificados

Línea celular	Muestra preparación		Resultados de flujo	intensidad
	reducida	no reducida		
A-375	50+2 kDa	100+5 kDa	11,08	+++
MB435S	50+2 kDa	100+5 kDa	15,8	++++
MB231	50+2 kDa	100+5 kDa	14,2	++
MCF7	50+2 kDa	100+5 kDa	4,63	+
PANC-1	-	-	8,95	-
DAUDI	-	-	1	-
RAMOS	50+2 kDa	100+5 kDa	1,1	+++

Tabla 9A: Resumen de las proteínas identificadas mediante CL-EM/EM del punto "C" 2D

Punto 'C' 2D. 48,8 kDa de M0A-M8-435S				
Nº acceso	ID proten	PM/Pi	Péptidos	Emparejamiento a 2DE
gi 4501989	alfa-fetoproteína [Homo sapiens] (AFP)	68813/5,2	30	✓
gi 231315	inhibidor de alfa-1 proteinasa	39099/5,27	7	C
gi 224224	alfa-1-antitripsina	46731/4,35	6	C

c- contaminante de purificación simultánea;
x - no se corresponde con el Pi y/o PM observado;
✓ = se corresponde con Pi y Pm

5

Tabla 9B: Resumen de las proteínas identificadas mediante CL-EM/EM del punto "D" 2D

2D Punto 'D' . 45+2kDa				
Nº acceso	ID proteína	Pm/Pi	Péptidos	Emparejamiento a 2DE
gi 105583	molécula de adhesión celular CD44 humana	53585/5,4	3	✓
gi 87056	proteína relacionada con nucleolina - humana	77453/4,5	3	X
gi 2804273	alfa-actinina 4 [Homo sapiens]	102661/5,27	5	C
gi 34862435	Proteína ER 99/integrina	92713/4,72	2	X
gi 71620	actina-beta - bovina	41786/5,22	1	C

c- contaminante de purificación simultánea;
x - no se corresponde con el Pi y Pm observado;
✓ = se corresponde con Pi y Pm en el intervalo aceptable

Tabla 10: Resumen de las proteínas identificadas mediante CL-EM/EM para la banda 'E' de proteína
Banda de proteína 'E' .banda de 110 kDa de V81-008 1P (condiciones no reductoras)

Nº acceso	ID proteína	Pm/Pi	Péptidos	Emparejamiento a 2DE
gi 4501989	alfa-fetoproteína [Homo sapiens] (AFP)	68813/5,2	16	✓
gi 105583	molécula de adhesión celular CD44 humana	53585/5,4	8	✓
gi 20177936	proteína de choque térmico Hsp90-beta[Hsp84]	81912/4,77	10	X
gi 34862435	alfa-actinina	92713/4,72	2	C
gi 71620	actina-beta - bovina	41786/5,22	5	C
gi 55408	vimentina [Mus musculus]	54418/5,01	3	C

C- Contaminante de purificación simultánea;
x - no se corresponde con el Pi y Pm observado;
✓ = se corresponde con Pi y Pm en el intervalo aceptable

Tabla 11A: Lista de péptidos recuperados del EM/EM de AFP

Péptido	SEC ID N°
YGHSDCCSQSEEGR	46
HNCFLAHK	47
FIYEIAR	48
HPFLYAPTILLWAAR	49
IIPSCCK	50
AENAVECFQTK	51
ESSLLNQHACAVMK	52
TFQAITVTK	53
LSQKFTK	54
LVLDDVAHVHEHCCR	55
GDVLDCLQDGEK	56
IMSYICSQQDTLSNK	57
GQCIIHAENDEKPEGLSPNLNR	58
FLGDRDFNQFSSGEK	59
DFNQFSSGEK	60
DFNQFSSGEKNIFLASFVHEYSR	61
NIFLASFVHEYSR	62
RHPQLAVSVILR	63
HPQLAVSVILR	64
GYQELLEK	65
YIQESQALAKR	66
RSCGLFQK	67
LGEYYLQNAFLVAYTKK	68
KAPQLTSSSELMAITR	69
APQLTSSSELMAITR	70
MAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIIGHLCIR	71
LLACGEGAADIIGHLCIR	72
DLCQAQGVVALQTMKQEFLINLVK	73
QEFLINLVK	74
QKPQITEEQLEAVIADFSGLLEK	75

Tabla 11B: Lista de péptidos recuperados del análisis EM de CD44 purificada

NLQNVDMK - Exón 20 (SEC ID N°: 38)
YVQKGEYR - Exón 5 (SEC ID N°: 39)
KPSGLNGEASK - Exón 20 (SEC ID N°: 40)
YGFIEGHVVIPR - Exón 3 (SEC ID N°: 41)
TEAADLCK - Exón 2 (SEC ID N°: 42)
LVINSGNGAVEDR - Exón 19 (SEC ID N°: 43)
ESSETPDQFMTADETR - Exón 20 (SEC ID N°: 44)
TGPLSMTTQSQNSQSFSTSHGLEED - Exón v8-v9 (SEC ID N°: 45)

5

Tabla 12: Correspondencias de péptidos entre diferentes isoformas de CD44

Isoforma CD44	Número de acceso	Correspondencias de péptido	homología
CD44 PGP proteína Hutch	Gi 87056	2	100 %
CD44 E/Isoforma 3	GI 105583/ GI 48255939	8*	100 %
isoforma CD44 M4	GI 346672	1	58,7 %
Isoforma CD44 1 (precursor)	GI 48255935	8	100 %
CD44H/CD44s Isoforma 2 (convencional)	GI 48255937	7	100 %
CD44 isoforma 4	GI 48255941	7	100 %
CD44 isoforma 5/isoforma RC	GI 48255943	1	100 %

CD44 isoforma v3-v6	GI 11139066	2	100 %
antígeno que contiene CD44	GI 10432374	3	78,7 %
antígeno de linfocitos T de CD44	GI 13936302	1	100 %
isoforma CD44 M3	GI 346670	0	-
CD44 isoforma v6	GI 11139062	0	-
CD44 isoforma R1, R2	GI 87053	4	100 %

Tabla 13: perfiles de unión comparativos de VB1-008, anti-CD44, anti-AFP y anti-EGFR

Línea celular	VB1-008	Anti-CD44	Anti-AFP	Intensidad Ag	Anti-EGFR
MB435S	15,8	773,5	1,95	++++	33,1
MB231	14,2	292	1,3	++	149
A-375	13,3	368	1,3	+++	16
PANC-1	8,3	192,5	1,1	-	132,4
MCF-7	4,63	52	1,1	+	7
DAUDI	1	1,6	1,4	-	1,1
RAMOS	1,1	1,3	1,3	+++	1,2

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión que se une a la interfase 5-v8 de CD44E que comprende una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID; una
5 región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID; una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID; una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID; una región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID; y
10 una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID.
2. La proteína de unión de la reivindicación 1 que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID.
15
3. La proteína de unión de la reivindicación 1 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID.
4. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína de unión es un anticuerpo.
20
5. La proteína de unión de la reivindicación 4, en la que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
6. La proteína de unión de la reivindicación 5, en la que fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, y multímeros de los mismos o fragmentos de anticuerpo biespecíficos.
25
7. Una composición que comprende una cualquiera de las proteínas de unión de las reivindicaciones 1 a 6 con un excipiente, transportador, tampón o estabilizante farmacéuticamente aceptable.
30
8. Un inmunoc conjugado que comprende (1) una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que se une a la interfase 5-v8 de CD44E sobre o en una célula cancerosa, unido a (2) un agente terapéutico de cáncer que es citotóxico, citostático o bien previene o reduce de otra forma la capacidad de las células cancerosas para dividirse y/o experimentar metástasis.
35
9. El inmunoc conjugado de la reivindicación 8, en el que el agente terapéutico contra el cáncer es una toxina.
10. El inmunoc conjugado de la reivindicación 9, en el que la toxina es un polipéptido inactivante del ribosoma.
- 40 11. El inmunoc conjugado de la reivindicación 10, en el que la toxina se selecciona entre el grupo que consiste en gelonina, bouganina, saporina, ricina, cadena de ricina A, briyodina, difteria, restrictocina y exotoxina A de Pseudomonas.
- 45 12. El inmunoc conjugado de la reivindicación 10, en el que la toxina es bouganina modificada.
13. El inmunoc conjugado de la reivindicación 10, en el que la toxina es una forma truncada de la exotoxina A de Pseudomonas que consiste en los aminoácidos 252-608.
- 50 14. El inmunoc conjugado de la reivindicación 8 que comprende una proteína codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N°: 11.
15. El inmunoc conjugado de la reivindicación 8 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12 y 13.
- 55 16. El inmunoc conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 en el que la inmunotoxina se internaliza mediante la célula cancerosa.
17. Una composición que comprende el inmunoc conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16 con un excipiente, transportador, tampón o estabilizante farmacéuticamente aceptable.
60
18. El inmunoc conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.
- 65 19. Uso del inmunoc conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer.

20. El inmunoconjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 18, o el uso de la reivindicación 19, en el que el uso comprende adicionalmente el uso de uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales para el tratamiento o prevención del cáncer de forma simultánea, independiente o secuencial.
- 5 21. Un método para diagnosticar el cáncer en un mamífero que comprende las etapas de:
- (1) poner en contacto una muestra de ensayo de dicho mamífero con una cualquiera de las proteínas de unión de las reivindicaciones 1 a 6 de la invención que se une a un antígeno en o de la célula cancerosa en condiciones que permiten la formación de un complejo proteína de unión-antígeno;
- 10 (2) medir la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo; y
- (3) comparar la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo con la de un control.
22. Un agente diagnóstico que comprende (1) una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, unido a (2) una etiqueta que produce una señal detectable, directa o indirectamente.
- 15 23. El agente diagnóstico de la reivindicación 22, en el que la etiqueta es un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, una enzima, un agente de obtención de imágenes o un ion metálico.
24. Un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID N°: 11.
- 20 25. El inmunoconjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 18 o 20, o el uso de la reivindicación 19 o 20, en el que el cáncer es cáncer de mama.
- 25 26. El método de acuerdo con la reivindicación 21 en el que el cáncer es cáncer de mama.

Figura 2

VB1-008

V_H

SEC ID Nº:10
SEC ID Nº:9

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TTG GGT CCA AGG CTG GTG AGG CCT TCA CAG ACC CTG
Q V Q L Q E L G P R L V R P S Q T L

ATC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGA GGC TCC GTC AGC GGC GAT GAG TAT TAC TGG
I L T C T V S G G S V S G D E Y Y W

CDR 1(H)

AGT TGG CTC CGT CAG ACC CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG ATT GGG TAC ATG TCT
S W L R Q T P G K G L E W I G Y M S

TAC AGA GGG AGC AGT TAT TAC AGT CCG TCC CTC CAG AGT CGA GTT ACC ATT GCA
Y R G S S Y Y S P S L Q S R V T I A

CDR 2(H)

GTG GAC AGG TCC AAG AAC GAA TTT TCC CTG AAG CTG ACG TCT GTG ACT GCC GCA
V D R S K N E F S L K L T S V T A A

GAC GCG GCC GTA TAT TTC TGT GCC AGA AAA TAT TGT GGT GGC GAT TGC AGG AGT
D A A V Y F C A R K Y C G G D C R S

CDR 3(H)

GGT TTT GAT ATC TGG GGC CGA GGG ACA ATG GTC ACC GTC GCT TCA
G F D I W G R G T M V T V A S

Figura 3

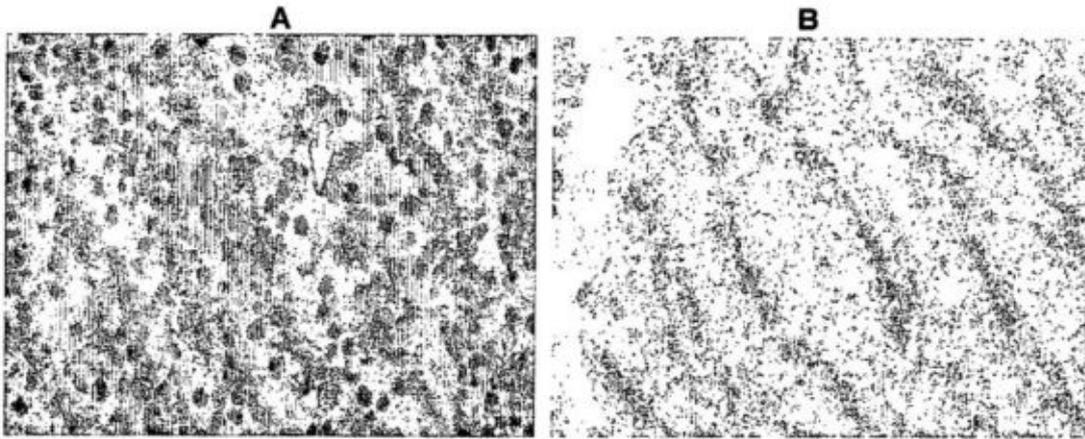


Figura 4

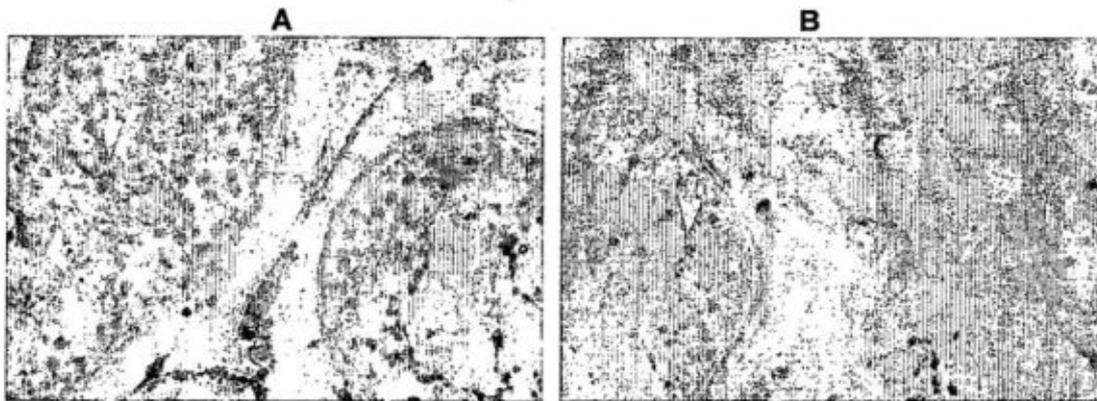


Figura 5

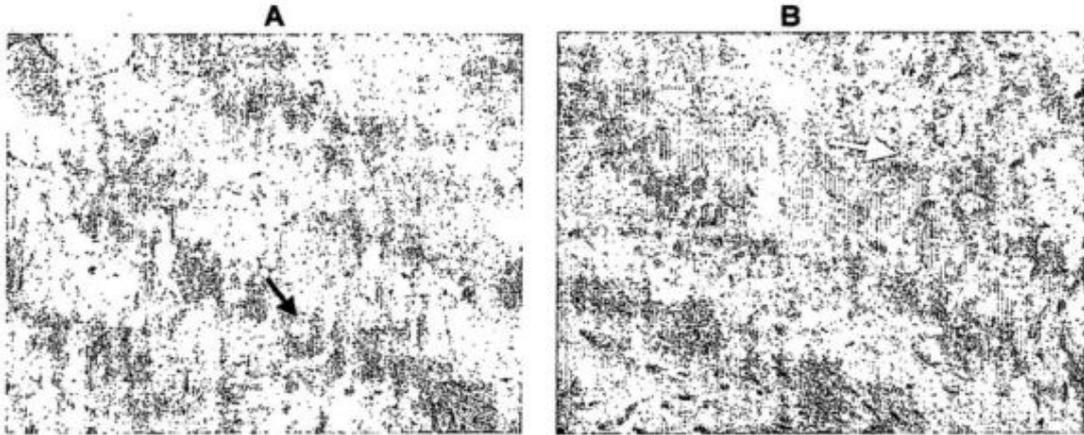


Figura 6

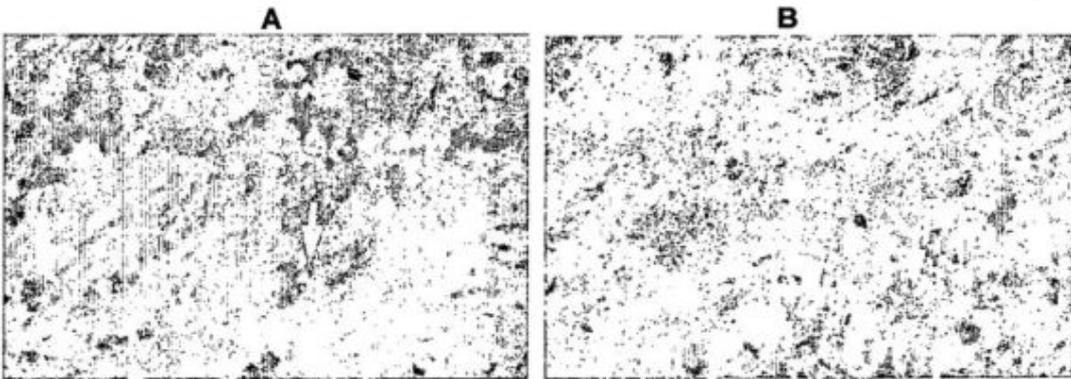


Figura 7

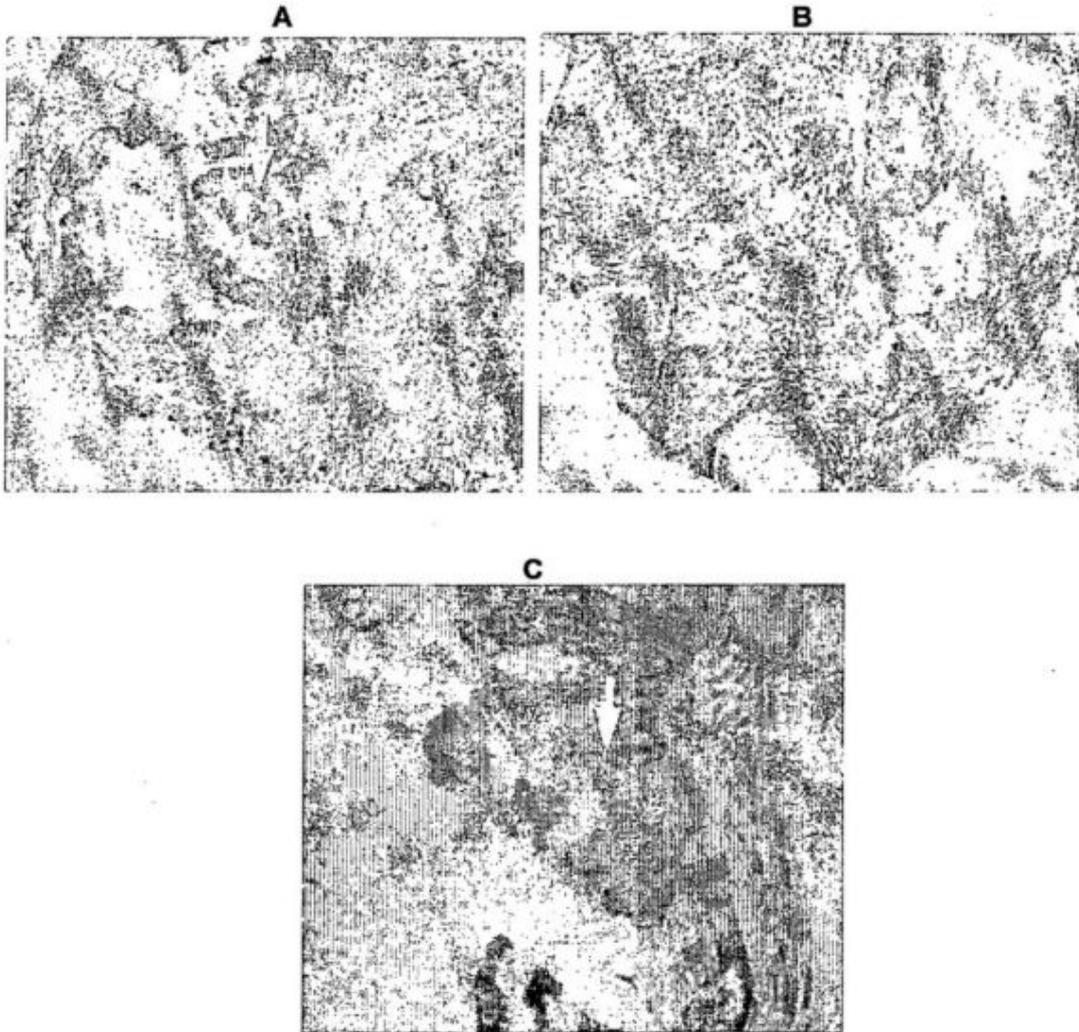


Figura 8

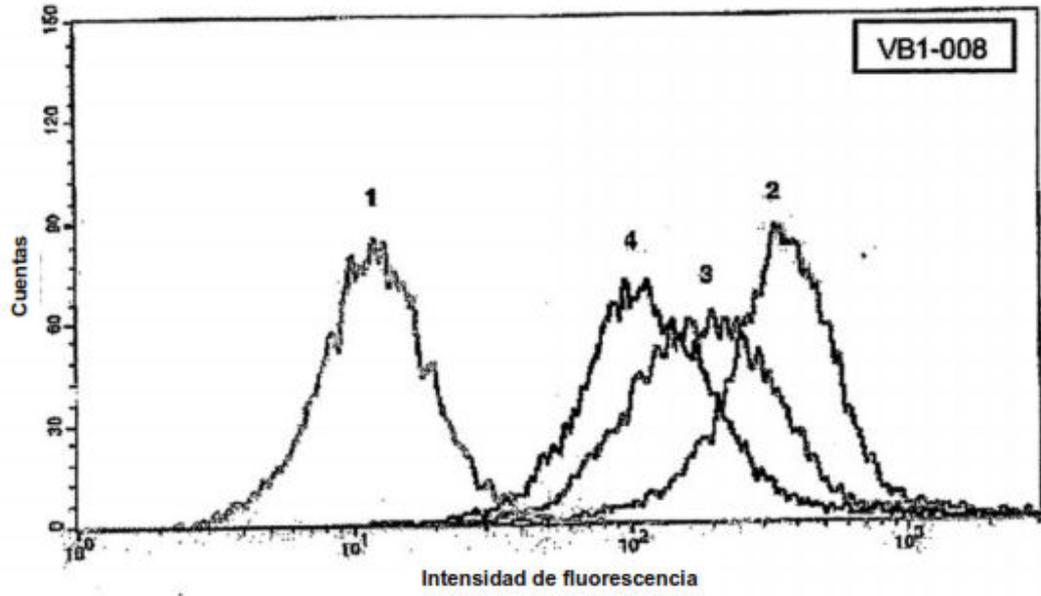


Figura 9

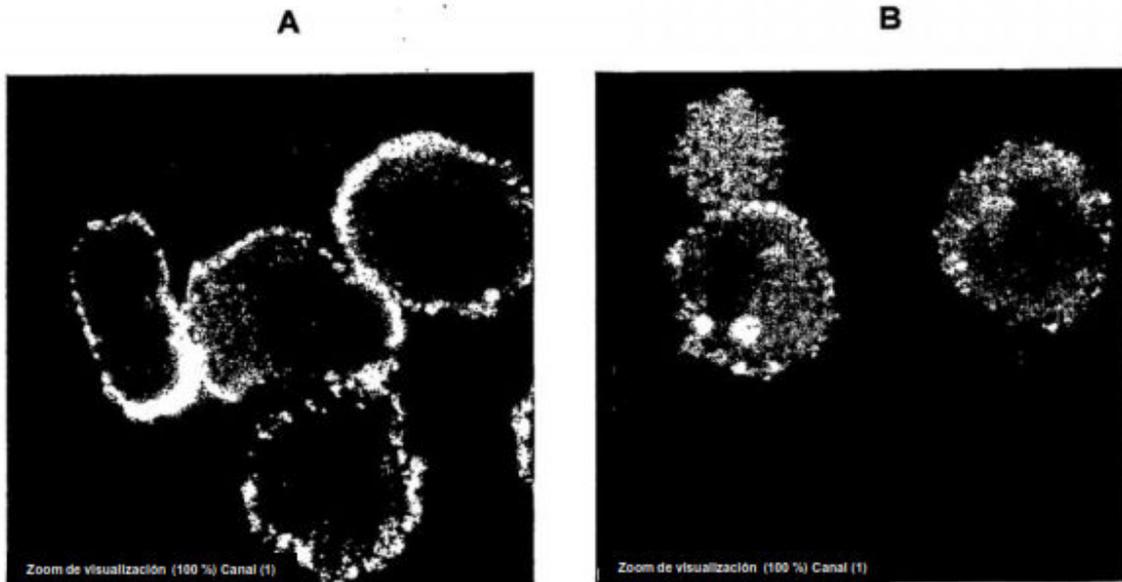


Figura 10A

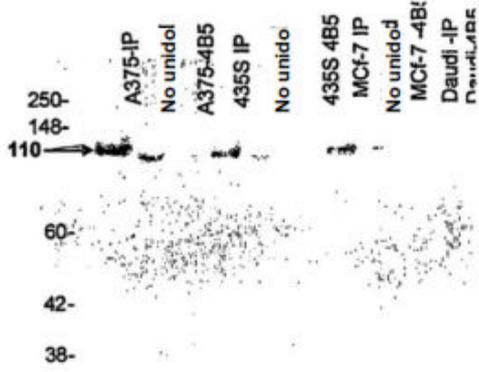


Figura 10B

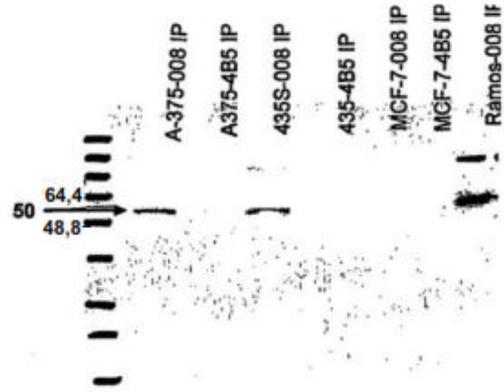


Figura 10C

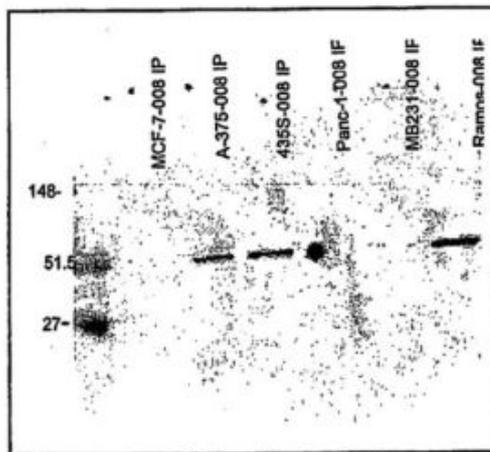


Figura 11A

Figura 11B

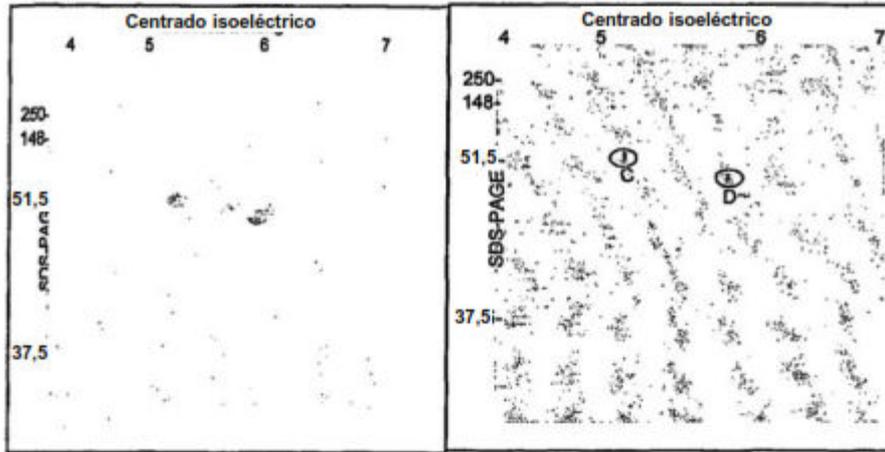


Figura 12A

```

MKWVESIFLI FLLNFESRT LHRNEYGIAS ILDSYQCTAE ISLADLATIF
51 FAQFVQEATY KEVSKMVKDA LTAIEKPTGD EQSSGCLENQ LPAFLEELCH
101 EKEILEKYGH SDCCSQSEEG RHNCFLAHKK PTPASIPLFQ VPEPVSCEA
151 YEEDRETFMN KFIYEIARRH PFLYAPTILL WAARYDKIIP SCCKAENAVE
201 CFQTKAATVT KELRESSILN QHACAVMKNF GTRTFQAITV TKLSQKFTKV
251 NFTEIQKLVL DVAHVHEHCC RGDVLDCLQD GEKIMSYICS QQDTLSNKIT
301 ECCKLTTLER GQCIIHAEND EKPEGLSPNL NRFLGDRDFN QFSSGEKNIF
351 LASFVHEYSR RHPQLAVSVI LRVAKGYQEL LEKCFQ TENP LECQDKGEEE
401 LQKYIQESQA LAKRSCGLFQ KLGEYYLQNA FLVAYTKKAP QLTSSSEIMAI
451 TRKMAATAAT CCQLEDKLL ACGEGAADII IGHLCIRHEM TPVNPVGVC
501 CTSSYANRRP CFSSLVVDET YVPPAFSDDK FIFHKDLCQA QGVALQTMKQ
551 EFLINLVKQK PQITEEQLEA VIADFSGLLE KCCQGQEQEV CFAEEGQKLI
601 SKTRALGV
    
```

Cobertura de la secuencia de alfa-proteína

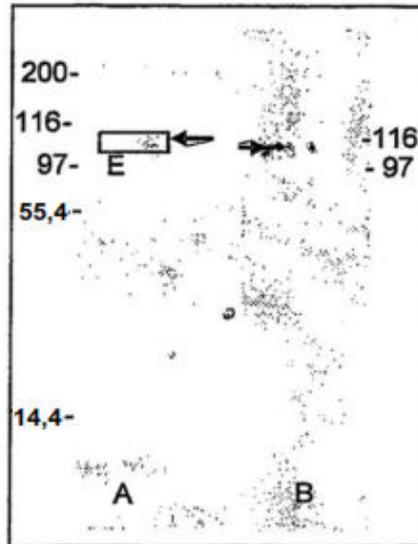
Figura 12B

```

MKWVESIFLI FLLNFESRT LHRNEYGIAS ILDSYQCTAE ISLADLATIF
51 FAQFVQEATY KEVSKMVKDA LTAIEKPTGD EQSSGCLENQ LPAFLEELCH
101 EKEILEKYGH SDCCSQSEEG RHNCFLAHKK PTPASIPLFQ VPEPVSCEA
151 YEEDRETFMN KFIYEIARRH PFLYAPTILL WAARYDKIIP SCCKAENAVE
201 CFQTKAATVT KELRESSILN QHACAVMKNF GTRTFQAITV TKLSQKFTKV
251 NFTEIQKLVL DVAHVHEHCC RGDVLDCLQD GEKIMSYICS QQDTLSNKIT
301 ECCKLTTLER GQCIIHAEND EKPEGLSPNL NRFLGDRDFN QFSSGEKNIF
351 LASFVHEYSR RHPQLAVSVI LRVAKGYQEL LEKCFQ TENP LECQDKGEEE
401 LQKYIQESQA LAKRSCGLFQ KLGEYYLQNA FLVAYTKKAP QLTSSSEIMAI
451 TRKMAATAAT CCQLEDKLL ACGEGAADII IGHLCIRHEM TPVNPVGVC
501 CTSSYANRRP CFSSLVVDET YVPPAFSDDK FIFHKDLCQA QGVALQTMKQ
551 EFLINLVKQK PQITEEQLEA VIADFSGLLE KCCQGQEQEV CFAEEGQKLI
601 SKTRALGV
    
```

AFP truncado - homología de secuencia del 54 % -
homología de secuencia del 100 %

Figura 13



Perfil SDS-PAGE/Western de la banda de 100 kDa posterior a VB1-008IP

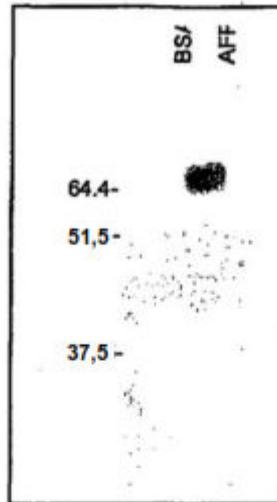
Figura 14

```

MDKFWHAAW  GLCLVPLSLA  QIDLNITCRF  AGVFHVEKNG  RYSISRTEAA  DLCKAFNSTL
PTMAQMEKAL  SIGFETCRYG  FIEGHVVIPR  IHPNSICAA  NTGVYILTSN  TSQYDYCFN
ASAPPEEDCT  SVTDLPNADF  GPITITIVNR  DGTRYVOKGE  YRTNPEDIYP  SNPTDDDVSS
GSSSERSSTS  GGYIFYTFST  VHPIPEDDSP  WITDSTDRI  P  ATNMDSSHSI  TLQPTANPNT
GLVEDLDRTG  PLSMTTQSN  SQSFSTSHEG  LEEDKDHP  TT  STLSSNRND  VTGGRRDPNH
SEGSTLLEG  YTSHYPHTKE  SRTFIPVTS  A  KTGSGVTA  V  TVGDSNSNV  N  RSLSGDQDTF
HPSGGSHTH  GSESDGSHG  SQEGGANTTS  GPIRTPQI  PE  WLIILASLL  A  LALILAVCIA
VNSRRRCGQK  KKLVINSGN  G  AVEDRKPSGL  NGEASKSOEM  VHLVNKESSE  TPDQFM  TADE
TRNLQNVDMKIGV
    
```

Cobertura de la secuencia de CD44 isoforma 3

Figura 15A



Validación de AFP como parte del complejo de antígeno

Figura 15B

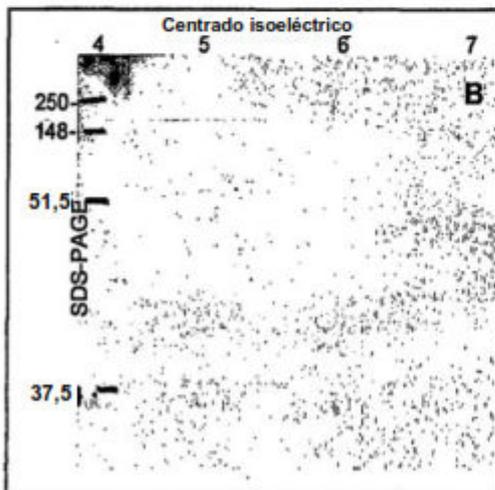
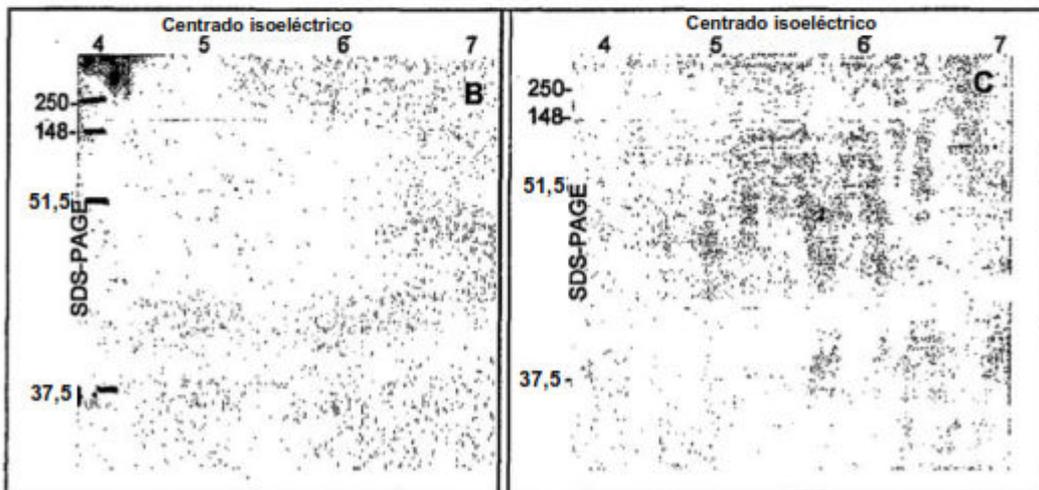
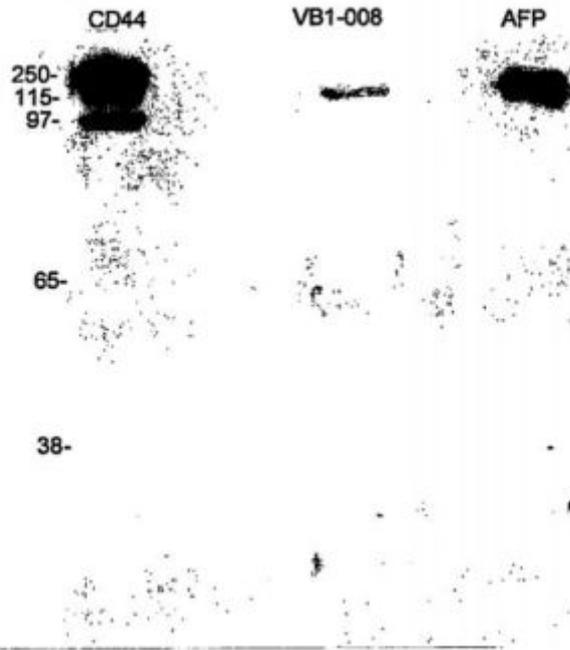


Figura 15C



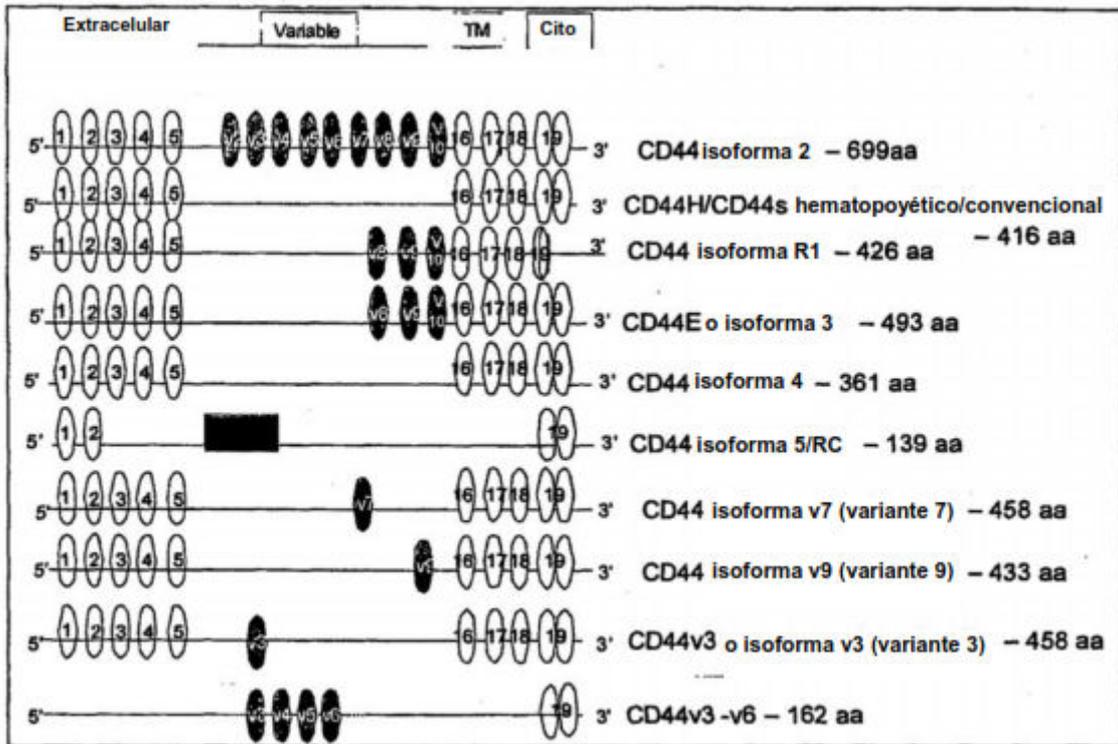
Confirmación del 2D-PAGE usando anti-AFP y anti-CD44

Figura 16



Reactividad cruzada de AFP para CD44

Figura 17



Representación esquemática de los isómeros de CD44 en seres humanos

Figura 18A

CD44E/ cd44-isoforma-3

```

MDKFWHAAW GLCLVPLSLA QIDLNITCRF AGVFHVEKNG RYSISRTEAA DLCKAFNSTL
PTMAQMEKAL SIGFETCRYG FIEGHVVIPR IHPNSICAN NTGVYILTSN TSQYDTCFN
ASAPPEEDCT SVTDLPNAFD GPITITIVNR DGTRYVQKGE YRTNPEDIYP SNPTDDDVSS
GSSSERSTTS GGYIFYTFST VHPIPEDDSP WITDSTRIP ATNMDSSHSI TLQPTANPNT
GLVEDLDRTG PLSMTTQOSN SQSFSTSHEG LEEDKDHPPT STLTSSNRND VTGGRDPNH
SEGSTLLEG YTSHYPHTKE SRTFIPVISA KTGSGVTAV TVGDSNSNVN RSLSGDQDTF
HPSGGSHTTH GSESDGSHG SQEGGANTTS GPIRTPQIPE WLIILASLLA LALILAVCIA
VNSRRRCGQK KKLVINSGNG AVEDRKPSGL NGEASKSQEM VHLVNKESSE TPDQFMTADE
TRNLQNVDMKIGV
    
```

Exón 5-V8 = STRIPATNMDSSHSIT - 17a

Figura 18B

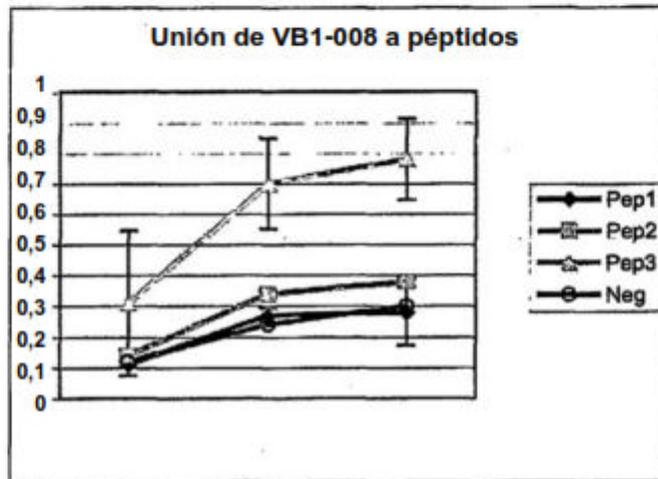


Figura 19A

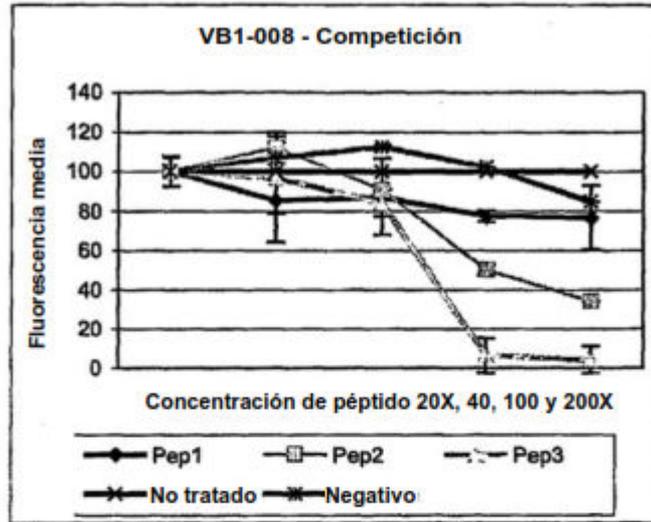


Figura 19B

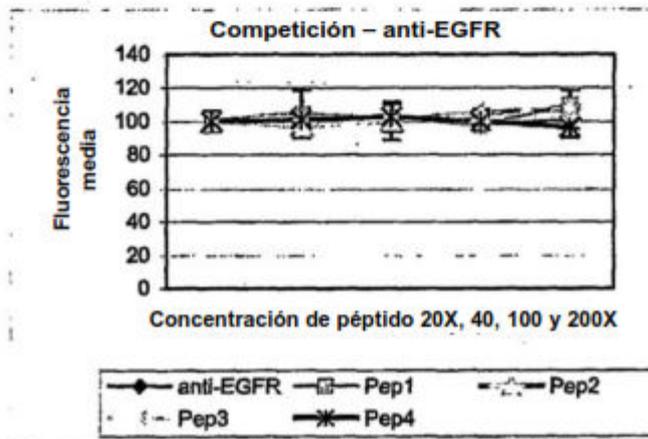


Figura 20

Secuencia de nucleótidos de VB-006 /SEC ID N°:11

GAATTCCTGCAGGTCTATGGAACGATAAAATGCCCATGAAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAatgaaatacc
tattgacctacggcagccgctggattgttattactcgctgcccaccagcgatggcgCAGGTGCAGCTGCAGGAGT
TGGGTCCAAGGCTGGTGAGGCCCTTCACAGACCCCTGATCCTCACCTGCACTGTCTCTGGAGGCTCCGTCAGCGGCG
ATGAGTATTACTGGAGTTGGCTCCGTCAGACCCAGGGAAGGGCCCTGGAGTGGATTGGGTACATGTCTTACAGAG
GGAGCAGTTATTACAGTCCGTCCCTCCAGAGTCGAGTTACCATTGCAGTGGACAGGTCCAAGAACGAATTTCCC
TGAAGCTGACGTCTGTGACTGCCGCGAGACCGGCCGTATATTTCTGTGCCAGAAAATATTGTGGTGGCGATTGCA
GGAGTGGTTTTGATATCTGGGGCCGAGGGACAATGGTCACTGTGCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
CGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGCTGCACACCTTCCC GGCTGTCTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGACCAGGCACAGGCAGCC
CAGAGGCTGGGAGCAGCTCTACAACACTGTGTCAATTAACCTTGGAGAAGCTTATGAGTACCCCACTTTTATACA
AGATTTGCGCAATGAATTGGCTAAGGGCACACCAGTATGTCAACTTCCAGTGACACTACAAACCATAGCCGATGA
CAAGCGATTTGTTCTAGTTGATATCACTACGACCTCGAAGAAAACAGTTAAGGTTGCTATAGATGTGACAGATGT
GTATGTTGTGGGTTATCAAGACAAATGGGATGGCAAAGATCGAGCTGTTTTCTTGGACAAGGTTCTACTGTTGC
AACTAGTAAACTTTTCCCAGGGGTGACTAATCGTGAACGTTAACATTTGATGGCAGCTATCAGAAACTTGTGAA
TGCTGCCAAAGCTGATAGAAAGGCTCTCGAAGTGGGGTTAACAAATTTGAATTTTCCATTGAAGCAATCCATGG
TAAAACGATAAAATGGTCAAGAGGCAGCCAAGTTCTTTCTTATTGTCATCCAAATGGTTTCAGAGGCAGCTCGGTT
CAAATATATTGAGACTGAGGTGGTTGATAGAGGATATATGGATCATTCAAACCTAATTTTAAAGTATTGAACTT
GGAGAACAATGGGGCGACATCTCTGATGCCATTCAAAATCATCCCACAATGTACCCTATTAATCCGGCACT
TCAGTTGATAAGCCCTCAAATGACCCATGGGTTGTAATAAAAGTGAAGTCAAATTAAGTCCCGATATGGGTATCCT
TAAGTTTAAAGCTCAAATAGTGAAGTCACTCTAGACTGCAGGCTATGGAACGATAAAATGCCCATGAAAATTC
TATTTCAAGGAGACAGTCATAatgaaataacctattgacctacggcagccgctggattgttattactcgctgcccac
ccagcgatggcgCATCACCATCACCATCACTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCAGGACAG
AAAGCCTTCATAACCTGCTCTGGAGATAACCTGGGGAATAAATATGTGTGCTGGTATCAACAGAAGCCAGGCCAG
TCCCCTGTCCCTGGTCACTATGAAGATACCAAGAGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGCCCTCCAACCT
GGGAATACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACGAGCCTATAGATGAGGCTGACTACTACTGTGTCAGGCGTGGGAC
AGCCGCACTGAAATCTTCGGAACCTGGGACCAAGTCAACCGTCTAAGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACT
CTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTACTTCTACCCG
GGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCGCTCAAGCCGGGAGTGGAGACCACCAACCCCTCCAAA
CAGAGCAACAACAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTAC
AGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCCTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTATAGTACTCGAG

Figura 21 |

VB6-008

PEIB-V_{H008}-C_H-F-de-bouganina (SEC ID N°:12)

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLQELGPRLVPRVPSQTLILTCTVSGGVSVD EYYWSWLRQTPGKLEWIGYM
SYRGSYSYPSLQSRVTIAVDRSKNEFSLKLTSTVAADA AVYFCARKYCGGDCRS GFDIWRGTMVTVASASTKG
PSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCTRRHRQPRGWEQLYNTVSNLGEAYEYPTFIQDLRNLAKGTPVCQLPVTLQT
IADDKRFVLVDITTTSKTKVKAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPVTVNRVTLTFDGSYQ
KLVNAAKADRKALELGVNKLEFSIEAIHGKTINGQEA AKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFK
VLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDP VVWVNVKVSQISPD MGILKFKSSK

PeIB-V_{L008}-C_L (SEC ID N°:13)

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAHHHHHYELTQPPSVSVSPGQKAFITCSGDN LGNKYVCWYQQKPGQSPV LVIY
EDTKRPSGIPERFSASNSGNTATLTISGTQPID EADYICQAWDSRTEIFGTGTVTVLSQPKANPTVTLFPSS E
ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE
GSTVEKTVAPTECS

Figura 22

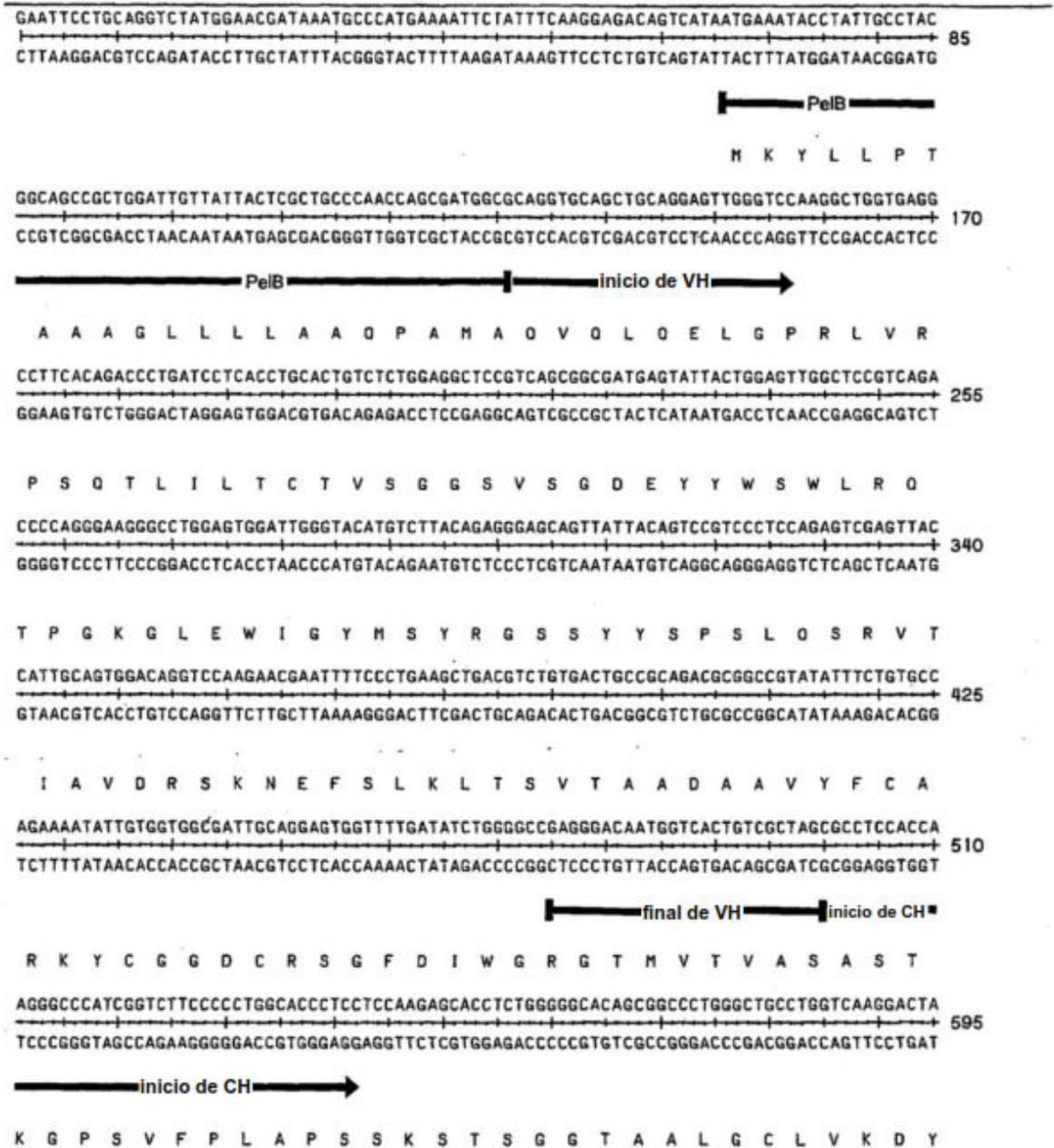


Figura 22 (continuación)

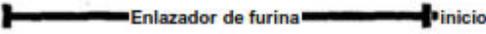
CTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCA
 GAAGGGGCTTGGCCACTGCCACAGCACCTTGAGTCCGCGGGACTGGTCGCCGCACGTGTGGAAGGGCCGACAGGATGTCAGGAGT 680

F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S

GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 CCTGAGATGAGGGAGTGTGCGCACCCTGGCACGGGAGGTCGTCGAACCCGTTGGGCTGGATGTAGACGTTGCACTTAGTGTTCG 765

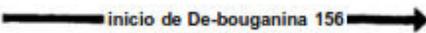
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T O T Y I C N V N H K

CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTACCAGGCACAGGCAGCCAGAGGCTGGGAGCAGCTCTACAA
 GGTGCTTGTGGTCCACCTGTTCTTTCAACTCGGGTTTAGAACATGGTCCGTGTCGGTCTCCGACCCCTCGTCGAGATGTT 850



P S N T K V D K K V E P K S C T R H R O P R G W E O L Y N

CACTGTGTCAATTTAACCTTGGAGAAGCTTATGAGTACCCCACTTTTATAAAGATTTGCGCAATGAATTGGCTAAGGGCACACCA
 GTGACACAGTAAATTGGAACCTCTTCAATACTCATGGGGTAAAAATATGTTCTAAACGCGTTACTTAACCGATTCCCGTGTGGT 935



T V S F N L G E A Y E Y P T F I O D L R N E L A K G T P

GSTATGCAACTTCCAGTGACACTACAACCATAGCCGATGACAAGCGATTGTTCTAGTTGATATCACTACGACCTCGAAGAAAA
 CATAAGTTGAAGSTCACTGTGATGTTGGTATCGGCTACTGTTGCTAAACAAGATCAACTATAGTGTGCTGGAGCTTCTTTT 1020

V C Q L P V T L O T I A D D K R F V L V D I T T T S K K

CAGTTAAGSTTGTATAGATGTGACAGATGTGTATGTTGGGTTATCAAGACAAATGGGATGGCAAAGATCGAGCTGTTTTCT
 GTCAATTCCAACGATATCTACACTGTCTACACATACAACACCCAATAGTTCTGTTTACCCTACCGTTTCTAGCTCGACAAAAGGA 1105

T V K V A I D V T D V Y V V G Y O D K W D G K D R A V F L

TGACAAGSTTCTACTGTTGCAACTAGTAAACTTTTCCAGGGGTGACTAATCGTGTAAACGTTAACATTTGATGGCAGCTATCAG
 ACTGTTCCAAGGATGACAACGTTGATCATTGAAAAGGGTCCCCTACTGATTAGCACATTGCAATTGTAACCTACCGTCGATAGTC 1190

D K V P T V A T S K L F P G V T N R V T L T F D G S Y O

AAACCTGTGAATGCTGCCAAAGCTGATAGAAAGGCTCTCGAACTGGGGTTAACAATTTGGAATTTTCCATTGAAGCAATCCATG
 TTTGAACACTTACBACGGTTTCGACTATCTTTCCGAGAGCTTGACCCCAATGTTTAACTTAAAAGGTAACCTCGTTAGGTAC 1275

K L V N A A K A D R K A L E L G V N K L E F S I E A I H

Figura 22 (continuación)

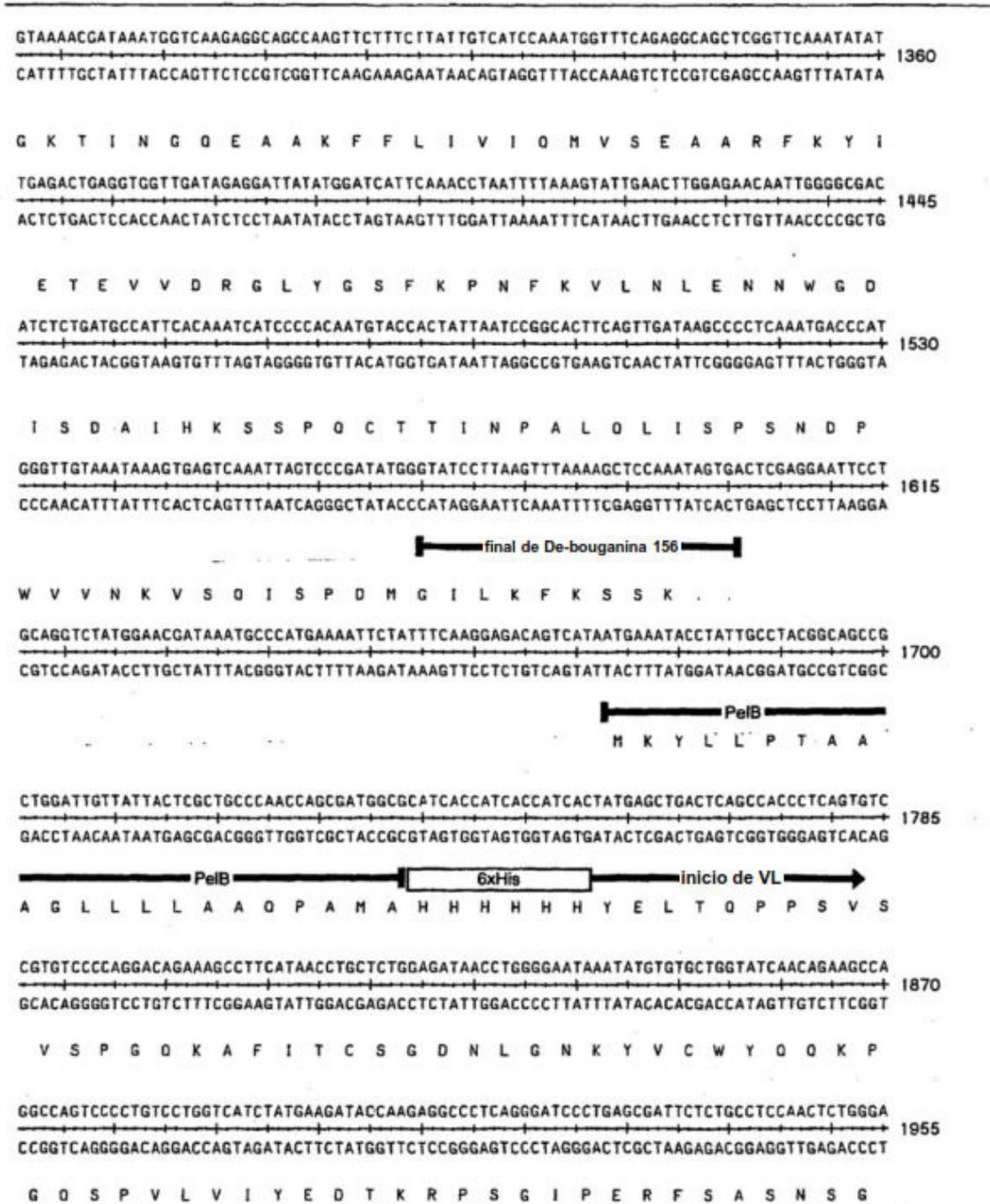
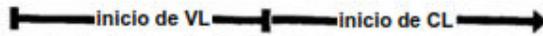


Figura 22 (continuación)

ATACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACGCAGCCTATAGATGAGGCTGACTACTACTGTTCAGGCGTGGGACAGCCGCACTGAAAT 2040
 TATGTCGGTGAGACTGGTAGTCGCCCTGCCGTCGGATATCTACTCCGACTGATGATGACAGTCCGCACCCTGTCCGGCGTACTTTA

N T A T L T I S G T O P I D E A D Y Y C O A W D S R T E I

CTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCTTAAGTCAGCCCAAGGCCAACCCTGTCACCTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG 2125
 GAAGCCTTGACCCTGGTTCCAGTGGCAGGATTCAGTCGGGTTCCGGTTGGGGTGACAGTGAGACAAGGGCGGGAGGAGACTCCTC



F G T G T K V T V L S O P K A N P T V T L F P P S S E E

CTCCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCA 2210
 GAGGTTCCGGTTGTTCCGGTGTGATCACACAGACTAGTCACTGAAGATGGGCCCTCGACACTGTCACCGGACCTCCGTCACCGT

L O A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D G

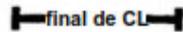
GCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCAACCCTCCAACAGAGCAACAACAAGTACGCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC 2295
 CGGGGACAGTTCGCCCTCACCTCTGGTGGTTTGGGAGBTTTGTCTCGTTGTTGTTTCATGCGCCGGTCTGATGGACTCGGACTG

S P V K A G V E T T K P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T

GCCCCGACAGTGGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACA 2380
 CGGGCTCGTCACCTTCAGGGTGTCTTCGATGTGACGGTCCAGTGCCTACTTCCCTCGTGGCACCTTCTGTACCGGGGATGT

P E D W K S H R S Y S C O V T H E G S T V E K T V A P T

GAATGTTTCATAGTACTCGAG 2401
 CTTACAAGTATCACTGAGCTC



E C S . .

Figura 23

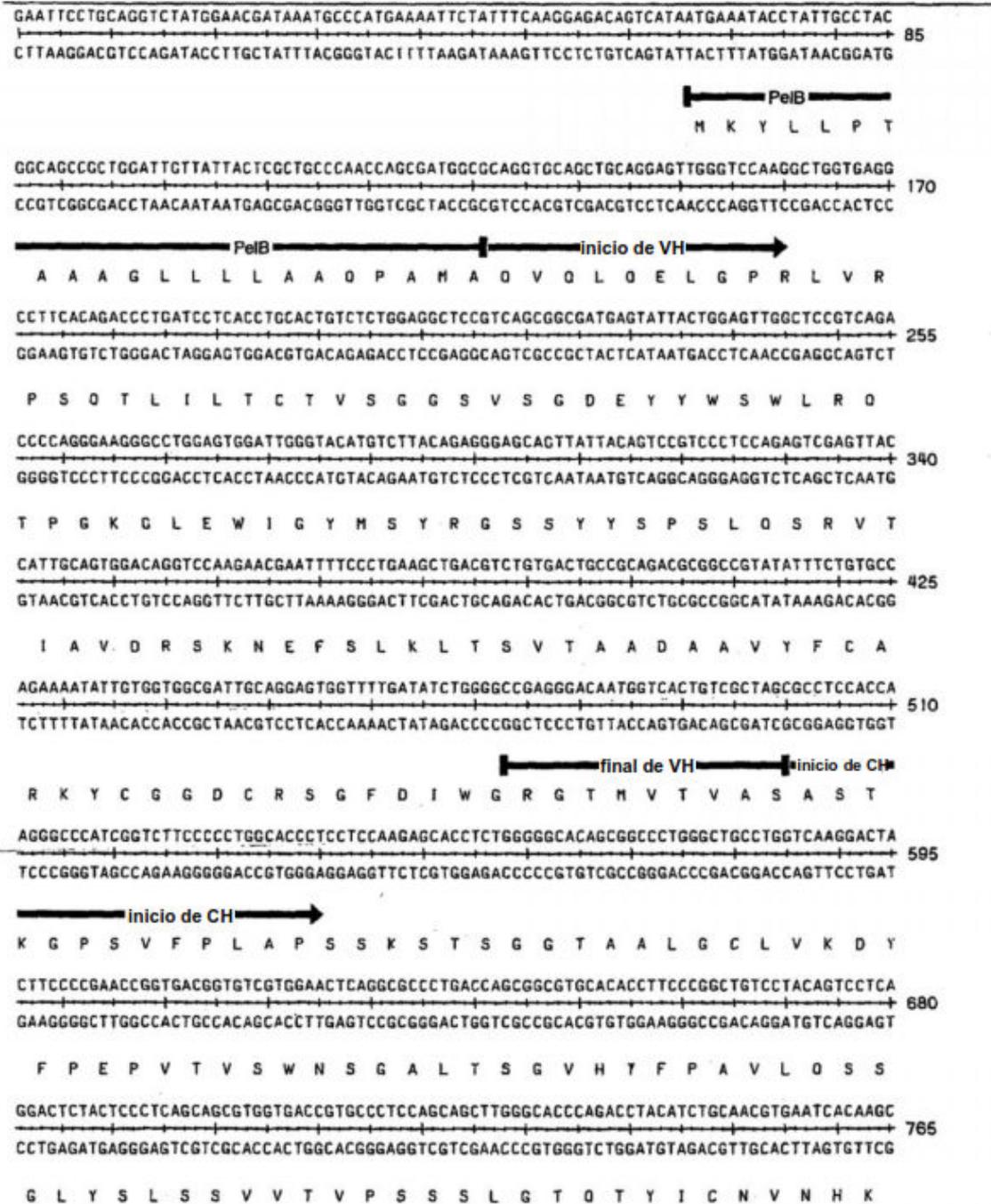


Figura 23 (continuación)

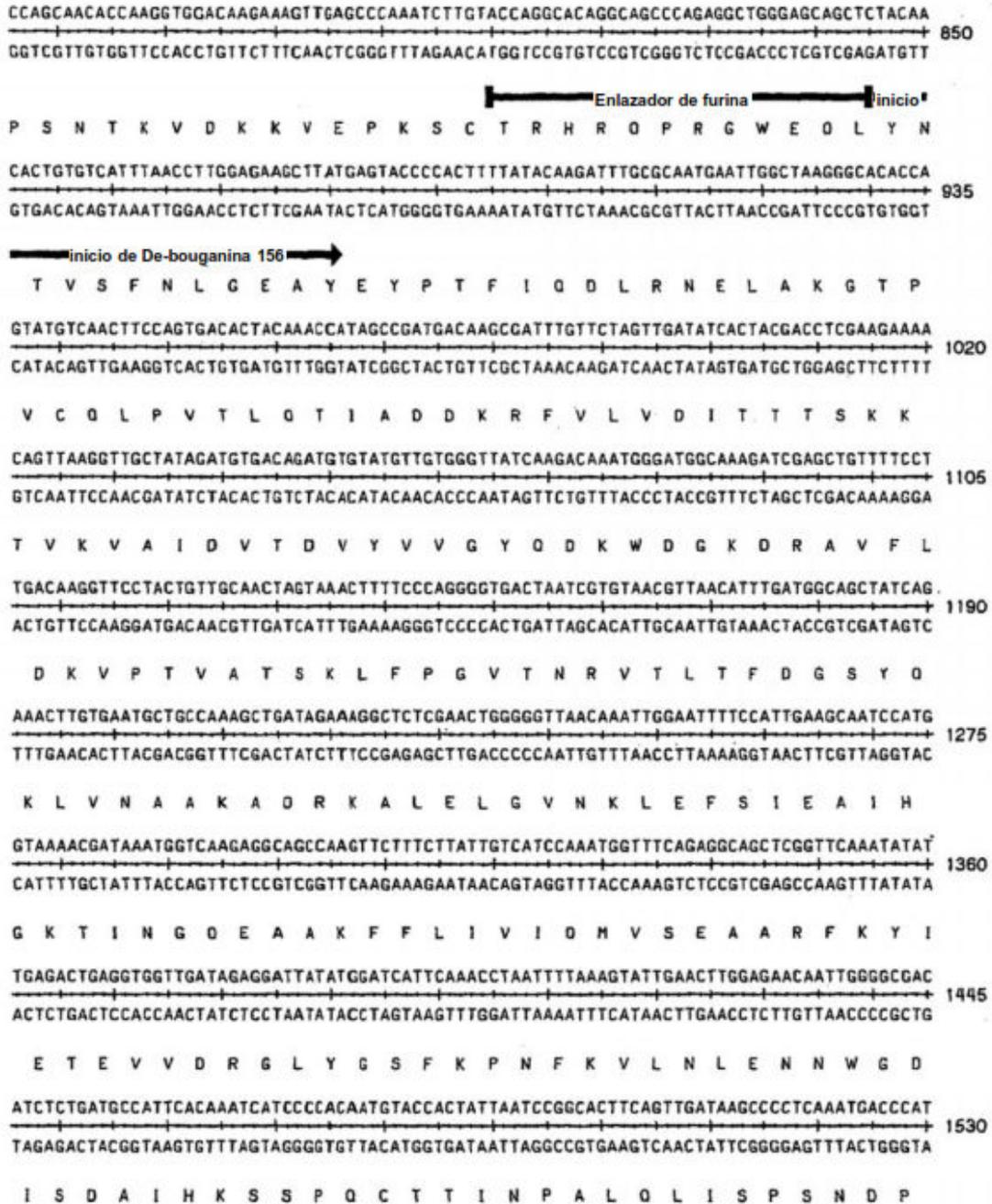


Figura 23 (continuación)

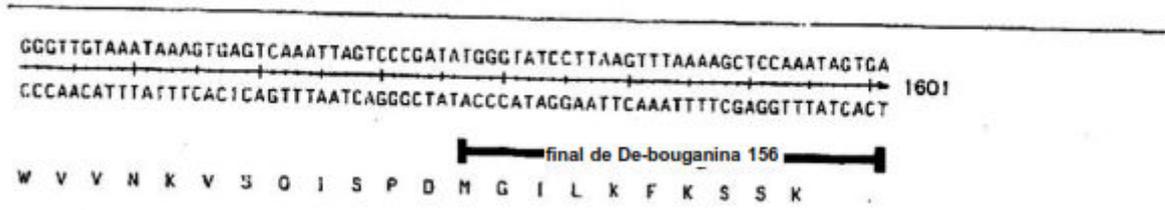


Figura 24

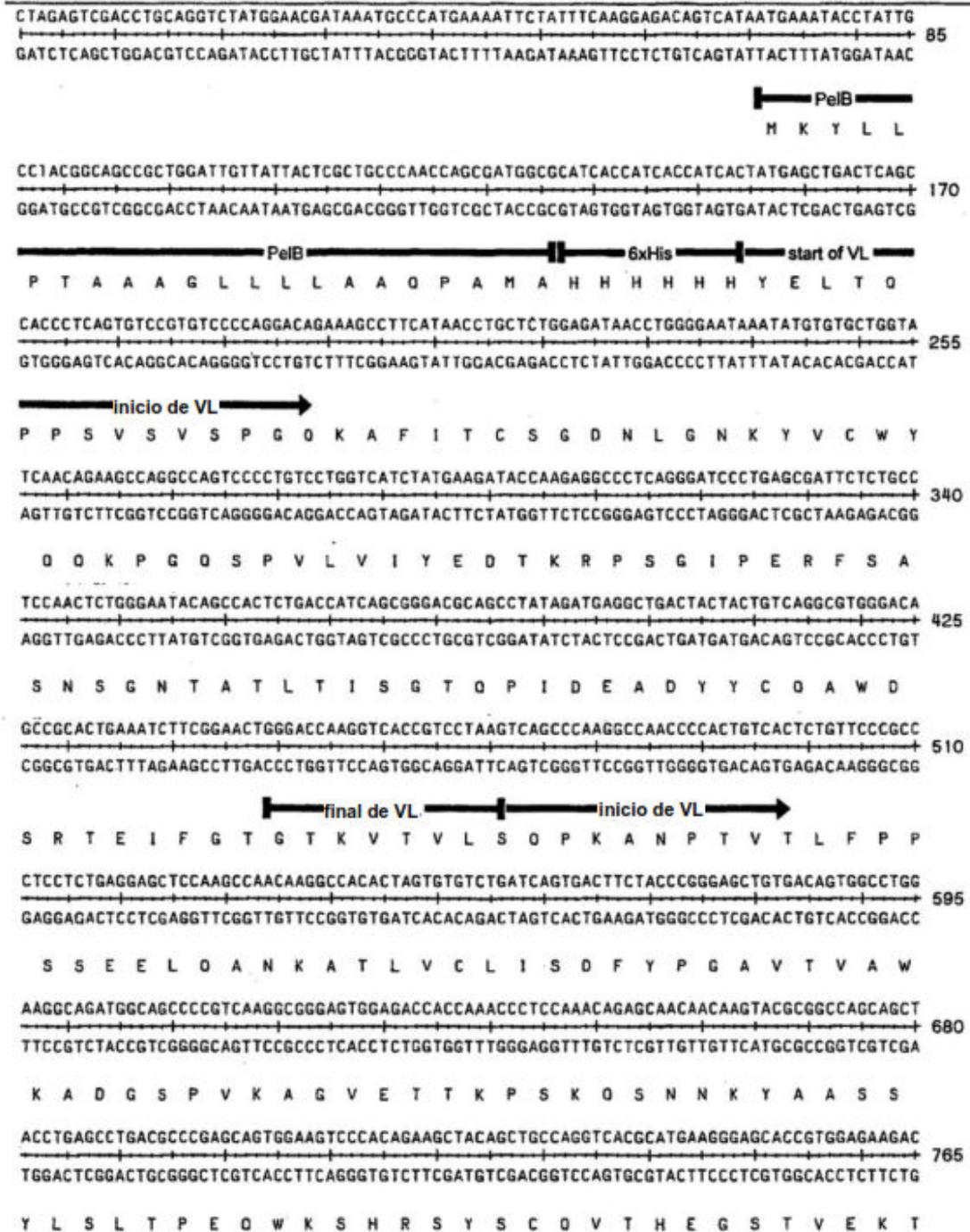


Figura 24 (continuación)

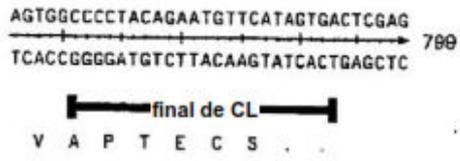
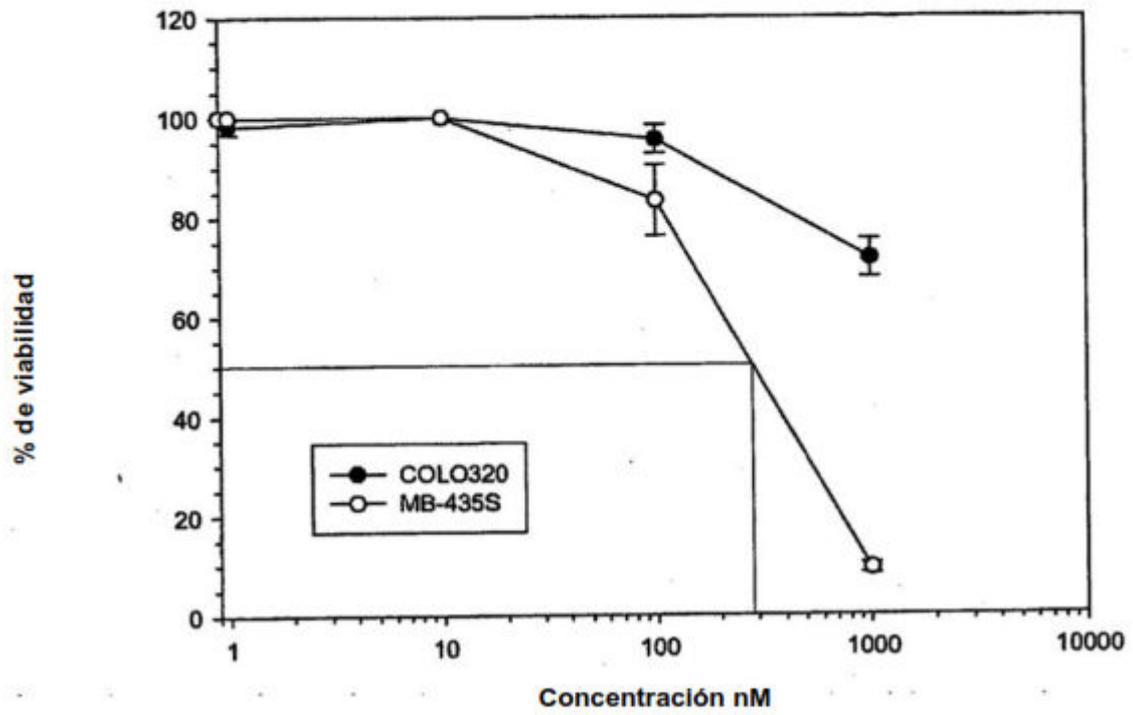


Figura 25

VB-008 modificado con bouganina



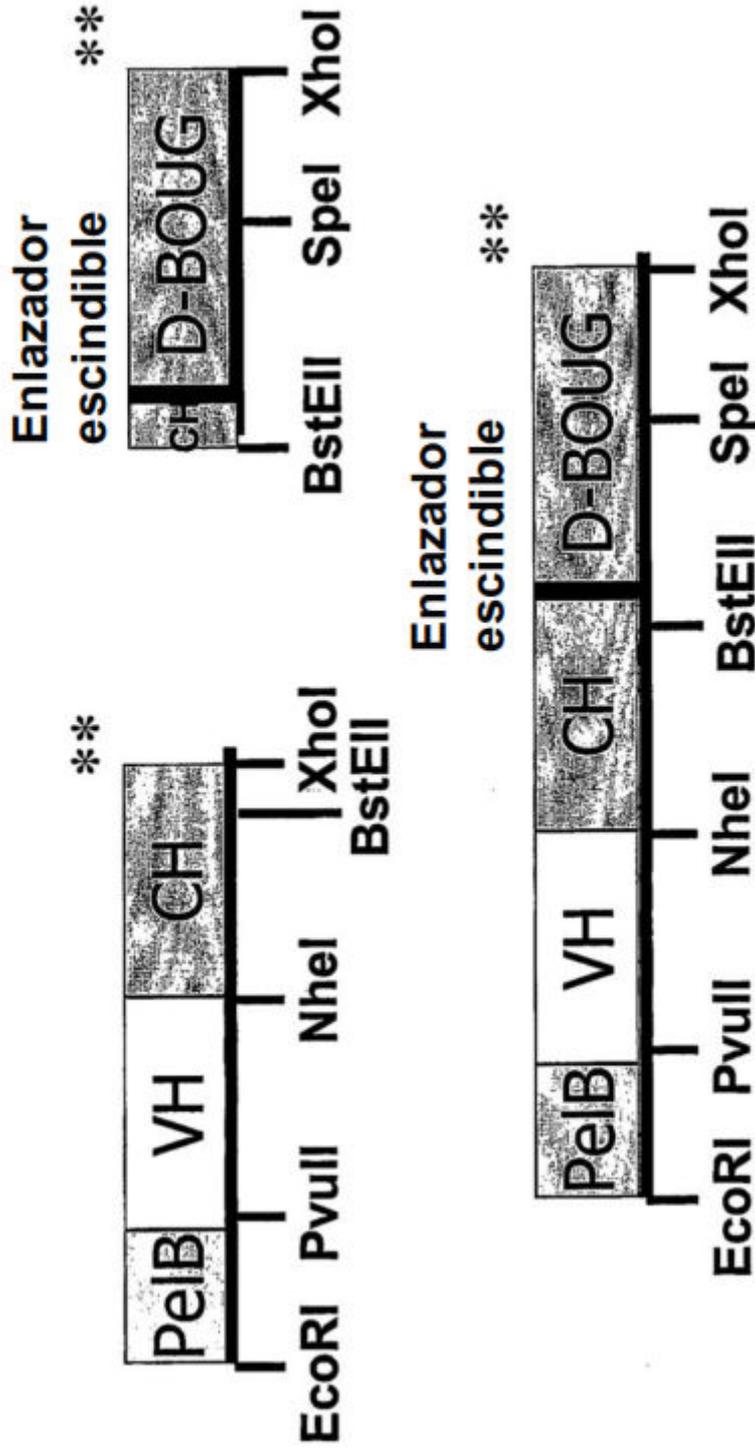


Figura 26

Figura 27

