

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 769**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2004 E 04757910 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 1613750**

54 Título: **Anticuerpos contra el antígeno del dominio de inmunoglobulina de células T y el dominio 1 de mucina (TIM-1) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.03.2003 US 456652 P

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

28.01.2016

73 Titular/es:

**AMGEN FREMONT INC. (100.0%)
6701 Kaiser Drive
Fremont, CA 94555, US**

72 Inventor/es:

**LANDES, GREGORY, M.;
CHEN, FRANCINE;
BEZABEH, BINYAM;
FOLTZ, IAN;
TSE, KAM FEI;
JEFFERS, MICHAEL;
STARLING, GARY;
MEZES, PETER;
KHRAMTSOV, NIKOLIA y
MESRI, MEHDI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 557 769 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el antígeno del dominio de inmunoglobulina de células T y el dominio 1 de mucina (TIM-1) y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

5 Campo de la invención

La invención divulgada aquí se relaciona con anticuerpos dirigidos a las proteínas antígeno de células T, dominio de inmunoglobulina y dominio 1 de mucina (TIM-1) y usos de tales anticuerpos. En particular, se proveen anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos al antígeno de TIM-1. Se proveen secuencias de nucleótidos que codifican, y las secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y liviana, particularmente secuencias que corresponden a secuencias de cadena pesada y liviana contiguas que cubren las regiones marco y/o las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), específicamente de FR1 hasta FR4 o CDR1 hasta CDR3. Se proveen también hibridomas u otras líneas celulares que expresan tales moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos monoclonales.

Descripción de la técnica relacionada

15 Una nueva familia de genes que codifican proteínas de células T, dominio de inmunoglobulina y dominio de mucina (TIM) (tres en humanos y ocho en ratones) ha sido descrita recientemente con papeles emergentes en inmunidad. Kuchroo et al., Nat Rev Immunol 3:454-462 (2003); McIntire et al., Nat Immunol 2:1109-1116 (2001). Los miembros de la familia del gen TIM residen en regiones cromosómicas, 5q33.2 en humanos y 11B1.1 en ratón, y han sido relacionados con alergia y enfermedades autoinmunes. Shevach, Nat Rev Immunol 2:389-400 (2002); Wills-Karp et al., Nat Immunol 4:1050-1052 (2003).

20 Un miembro de la familia TIM, TIM-1, también es conocido como receptor celular del virus de la hepatitis A (HAVcr-1) y fue descubierto originalmente como un receptor del virus de hepatitis A (HAV) (Kaplan et al, EMBO J 15(16):4282-96 (1996)). Este gen fue clonado posteriormente como una molécula 1 de lesión renal (KIM-1) (Ichimura et al., J Biol Chem 273:4135-4142 (1998); Han et al., Kidney Int 62:237-244 (2002)).

25 Kaplan *et al.*, aislaron el receptor celular para el virus de la hepatitis A a partir de una biblioteca de ADNc de una línea celular de Riñón de Mono Verde Africano (AGMK) que expresa el receptor. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 5,622,861. La utilidad divulgada de los polipéptidos y ácidos nucleicos fue diagnosticar la infección por el virus de hepatitis A, para separar el virus de la hepatitis A de impurezas en una muestra, para tratar la infección así como para prevenir la infección por el virus de hepatitis A. Adicionalmente, los polipéptidos pudieron ser expresados en células transformados y usados para probar la eficacia de los compuestos en un ensayo de enlazamiento antiviral de hepatitis A.

30 El homólogo humano, hHAVcr-1 (aka TIM-1), fue descrito por Feigelstock et al., J Virology 72(8): 6621-6628 (1998). Las mismas moléculas fueron descritas en las Publicaciones PCT Nos: WO 97/44460 y WO 98/53071 y en la Patente de los Estados Unidos No. 6,664,385 como Moléculas relacionadas con Lesión Renal (KIM) que se encontraron sobrerreguladas en tejido renal después de la lesión al riñón. Las moléculas fueron descritas como útiles en una variedad de invenciones terapéuticas, específicamente, enfermedad, trastorno o lesión renal. Por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 02/098920 describe anticuerpos para KIM y describe anticuerpos que inhiben el desprendimiento del polipéptido KIM-1 de células que expresan KIM-1 por ejemplo, células renales, o células de cáncer renal.

40 La TIM-1 es un tipo 1' de proteína de membrana que contiene un dominio similar a la inmunoglobulina de seis cisteínas novedoso y un dominio de mucina rico en treonina/serina/prolina (T/S/P). La TIM-1 fue identificada originalmente en ratas. La TIM-1 ha sido encontrada en ratón, mono verde africano y humanos (Feigelstock et al., J Virol 72(8):6621-8 (1998)). El ortólogo de mono verde africano está relacionado más cercanamente a la TIM-1 mostrando un 77.6% de identidad de aminoácidos a lo largo de 358 aminoácidos alineados. Los ortólogos de rata y ratón exhiben 50% (155/310) y 45.6% (126/276) de identidad en aminoácidos respectivamente, aunque a lo largo de segmentos más cortos de secuencia alienada que para el mono verde africano. Los anticuerpos monoclonales al dominio similar a Ig de TIM-1 han demostrado ser protectores contra la infección por el virus de hepatitis A *in vitro*. Silberstein et al., J Virol 75(2): 717-25 (2001). Además, el KIM-1 demostró ser expresado a bajo niveles en riñones normales pero su expresión se incrementa dramáticamente en riñones postisquémicos. Ichimura et al., J Biol Chem 273(7):4135-42 (1998). El HA VCR-1 también se expresa a niveles elevados en carcinomas de células limpias y líneas celulares cancerosas derivadas de las mismas.

50 La WO 02/098920 se relaciona con anticuerpos monoclonales de ratón para KIM-1 (molécula 1 de lesión renal) que se enlazan a polipéptidos reportados como expresados en células de riñón lesionadas o enfermas.

5 La TIM-1 muestra homología con el dominio "trifolio" tipo P sugiriendo que pueden tener actividad biológica similar a otros miembros de la familia trifolio tipo P. Algunas proteínas que contienen dominio trifolio han demostrado inducir la dispersión e invasión celular cuando se utilizan para tratar líneas celulares tumorales de riñón, colon y mama. Prest et al., FASEB J16 (6):592-4 (2002). Además, algunas proteínas que contienen trifolio confieren resistencia celular a anoiquis, un fenómeno de apoptosis relacionado con el anclaje, en el epitelio. Chen et al., Biochem Biophys Res Commun 274(3): 576-82 (2000).

10 La TIM-1 mapea a una región de cromosoma 5 humano conocida como Tapr en la región siténica murínica que ha sido implicada en el asma. La Tapr, un locus regulador principal de células T, controla el desarrollo de la hiperreactividad de las vías respiratorias. Wills-Kaip, Nature Immunology 2:1095-1096 (2001); McIntire et al., Nature Immunology 2: 1109-1116 (2001).

Resumen de la invención

15 Las realizaciones de la invención descritas aquí se basan en el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos, o fragmentos de enlazamiento de los mismos, que se enlazan a TIM-1 y afectan la función de TIM-1. La TIM-1 se expresa a niveles elevados en patologías, tales como neoplasmas y enfermedades inflamatorias. La inhibición de la actividad biológica de TIM-1 puede así prevenir la inflamación y otros efectos deseados, incluyendo la proliferación celular inducida por TIM-1. Las realizaciones de la invención están basadas en la generación e identificación de anticuerpos aislados, o fragmentos de enlazamiento de los mismos, que se enlazan específicamente a TIM-1.

20 De acuerdo con lo anterior, la invención provee un anticuerpo humano aislado o un fragmento de enlazamiento del mismo que se enlaza específicamente a dominio de inmunoglobulina y dominio de mucina (TIM-1) de células T, en donde dicho anticuerpo o fragmento de enlazamiento tiene un polipéptido de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende tres regiones determinantes complementarias (CDRs) y un polipéptido de cadena liviana que comprende tres CDRs, en donde los tres CDRs de cadena pesada y los tres CDRs de cadena liviana son seleccionados de:

25 (a) un CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos GFIFSRYGMH, un CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos VIWYDGSNKLYADSVK, una cadena CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDNSRHHWGFYD, una cadena CDR1 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos RSSRLLDSDDGNTYLD, una cadena CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos TLSYRAS, y una cadena CDR3 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos MQRVEFPIT; y

30 (b) una cadena CDR1 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSISSDGYYSWS, una cadena CDR2 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos YIYSGSTFYNSLKS, una cadena CDR3 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ESPHSSNWYSGFDC, una cadena CDR1 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSIGSRLH, una cadena CDR2 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos YASQSFS, y una cadena CDR3 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos HQSSNLPFT.

35 Las realizaciones de la invención descritas aquí también proveen una línea celular de hibridoma para producir el anticuerpo o fragmento de enlazamiento, y una célula transformada que comprende un gen que codifica el anticuerpo o fragmento de enlazamiento.

40 La invención se relaciona con anticuerpos anti-TIM-1 humanos y preparaciones de anticuerpos anti-TIM-1 con propiedades deseables desde una perspectiva terapéutica, incluyendo fuerte afinidad de enlazamiento por TIM-1, la capacidad de neutralizar TIM-1 *in vitro* e *in vivo*, y la capacidad de inhibir la proliferación celular inducida por TIM-1.

45 En una realización preferida, los anticuerpos descritos aquí se enlazan a TIM-1 con afinidades muy altas (Kd). Por ejemplo un anticuerpo humano, de conejo, de ratón, quimérico o humanizado que es capaz de enlazarse a TIM-1 con un Kd menor de, pero no limitado a 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o 10^{-14} M, o cualquier rango o valor entre ellos. Las mediciones de afinidad y/o avides pueden medirse por KinExA[®] y/o BIACORE[®], tal como se describe aquí.

También describimos un anticuerpo completamente humano que se enlaza a ortólogos de TIM-1, así como un anticuerpo que compite en forma cruzada para enlazarse a TIM-1 con los anticuerpos completamente humanos descritos aquí.

50 Adicionalmente se divulgan métodos para producir anticuerpos de alta afinidad a TIM-1 inmunizando un mamífero con TIM-1 humana, o un fragmento de la misma, o una o más secuencias ortólogas o fragmentos de las mismas.

Será evidente que las realizaciones de la invención no están limitadas a ninguna forma particular de un anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TIM-1 puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que tiene una

región Fc humana intacta) o un fragmento de anticuerpos (por ejemplo un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o anticuerpos de cadena sencilla). Además, el anticuerpo puede ser manufacturado a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo, o a partir de una célula producida de manera recombinante que ha sido transformada o transfectada con un gen o genes que codifican el anticuerpo.

5 También divulgamos moléculas de ácidos nucleicos aislados que codifican cualquiera de los anticuerpos anti-TIM-1 descritos aquí, vectores que tienen una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anti-TIM-1, y una célula huésped transformada con tal molécula de ácido nucleico. La invención provee una célula transformada que comprende un gen que codifica el anticuerpo o un fragmento de enlazamiento de la invención. Divulgamos un método para producir un anticuerpo anti-TIM-1 cultivando células huésped bajo condiciones en las que una molécula de ácido nucleico es expresada para producir el anticuerpo seguido por la recuperación del anticuerpo de las células huésped.

En otras realizaciones la invención provee composiciones, incluyendo un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención en mezcla con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 En aún otras realizaciones, el anticuerpo anti-TIM-1, o un fragmento del mismo, es conjugado a un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una toxina, un radioisótopo, o un agente quimioterapéutico. Preferiblemente, tales anticuerpos pueden ser utilizados para el tratamiento de patologías, incluyendo por ejemplo, tumores y cánceres, tales como cáncer de ovario, de estómago, de endometrio, de las glándulas salivales, pulmón, riñón, colon, colorrectal, de tiroides, pancreático, de próstata y de vejiga, así como otras condiciones inflamatorias. Más preferiblemente, los anticuerpos pueden ser utilizados para tratar carcinomas renales y ováricos.

La invención provee el anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la invención para uso en una medicina.

25 La invención provee el anticuerpo o fragmento de enlazamiento para uso en un método para tratar una enfermedad neoplásica. Preferiblemente, la enfermedad neoplásica es cáncer o tumor. En una realización particular, el cáncer es cáncer renal. Sin embargo, se abarca también el tratamiento de otros tumores y cánceres incluyendo cáncer de ovarios, de estómago, de endometrio, de glándulas salivales, pulmón, riñón, colon, colorrectal, de tiroides, pancreático y de vejiga.

30 Preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente, un humano, recibe el anticuerpo anti-TIM-1. En una realización preferida, se tratan neoplasmas, incluyendo, sin limitación, tumores renales y pancreáticos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovarios, cáncer gástrico (estómago), melanoma, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer esofágico, y cáncer de cerebro.

Enfermedades neoplásicas tratables incluyen, por ejemplo, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer pancreático y cáncer de próstata.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TIM-1 es administrado a un paciente, seguido por la administración de un agente clarificante para eliminar de la sangre el anticuerpo circulante en exceso.

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TIM-1 pueden ser modificados para potenciar su capacidad de fijar complementos y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En una realización, los anticuerpos anti-TIM-1 pueden ser modificados por ejemplo mediante una sustitución de aminoácidos, para alterar su eliminación del cuerpo. Alternativamente, algunas otras sustituciones de aminoácidos pueden hacer más lenta la eliminación del anticuerpo desde el cuerpo.

En otra realización, la invención provee un artículo de manufactura que incluye un contenedor. El contenedor incluye una composición que contiene un anticuerpo anti-TIM-1, de acuerdo con la invención y un inserto o etiqueta en el empaque que indica que la composición puede ser utilizada para tratar enfermedades neoplásicas o inflamatorias caracterizadas por una sobreexpresión de TIM-1.

45 Divulgamos métodos para probar el nivel de TIM-1 en una muestra de paciente, que comprende poner en contacto un anticuerpo anti-TIM-1 con una muestra biológica de un paciente, y detectar el nivel de enlazamiento entre dicho anticuerpo y el TIM-1 en dicha muestra. Por ejemplo la muestra biológica es sangre.

En una realización, la invención incluye un kit de ensayo para detectar TIM-1 en tejidos o células de mamíferos para buscar carcinomas renales.

50 El kit incluye un anticuerpo de acuerdo con la invención y medios para indicar la reacción del anticuerpo con TIM-1, si está presente. Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo que

enlaza a TIM-1 está marcado. En otra realización el anticuerpo es un primer anticuerpo no marcado y el kit incluye adicionalmente un medio para detectar el primer anticuerpo. En una realización, el medio incluye un segundo anticuerpo marcado que es una antiinmunoglobulina. Preferiblemente el anticuerpo está marcado con un marcador seleccionado del grupo consistente de un fluorocromo, una enzima, un radionúclido y un material radioopaco.

- 5 También divulgamos aquí un método para diagnosticar enfermedades o condiciones en las cuales un anticuerpo preparado como se describe aquí se utiliza para detectar el nivel de TIM-1 en una muestra de un paciente. Opcionalmente, la muestra del paciente es sangre o suero sanguíneo. Opcionalmente se presentan métodos para la identificación de factores de riesgo, diagnóstico de enfermedad, y determinación del estadio de la enfermedad que involucran la identificación de la sobreexpresión de TIM-1 utilizando anticuerpos anti-TIM-1.
- 10 Las realizaciones de la invención descritas aquí también son pertinentes a variantes de una proteína de TIM-1 que funciona como agonista de TIM-1 (imitadores) o como antagonistas de TIM-1.

Otro aspecto de la divulgación es el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno de TIM-1 acoplados con agentes quimioterapéuticos o agentes radioterapéuticos citotóxicos tales como agentes terapéuticos antitumorales.

- 15 Divulgamos un anticuerpo aislado que bloquea simultáneamente el enlazamiento a un antígeno de TIM-1 por un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50. También divulgamos un anticuerpo aislado que se enlaza a un antígeno de TIM-1 y que reacciona cruzadamente con un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del grupo consistente de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50.

Divulgamos también en un anticuerpo aislado que se enlaza a un epítipo de SEQ ID NO: 87 sobre el antígeno de TIM-1 de SEQ ID NO: 54 y que reacciona cruzadamente con un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionado del grupo consistente de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50.

- 25 También divulgamos que la invención provee un anticuerpo aislado que se enlaza a un epítipo de SEQ ID NO: 87 sobre el antígeno de TIM-1 de SEQ ID NO: 54, en donde dicho anticuerpo bloquea simultáneamente el enlazamiento al antígeno de TIM-1 por un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionado del grupo que comprende SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 y 50.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La figura 1 es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de ELISA de anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 1.29, 2.56.2, 2.59.2, y 2.45.1 contra el antígeno de TIM-1.

La figura 2 es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo de ELISA de anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 1.29, 2.56.2, 2.59.2, y 2.45.1 contra proteína irrelevante.

- 35 La figura 3 muestra la tinción de cáncer de células renales (3A) y cáncer pancreático (3B) con el anti-TIM-1 mAb 2.59.2.

La figura 4 es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo clonogénico de muerte de toxina mediada por anticuerpo monoclonal anti-TIM-1 en la línea celular de cáncer de riñón ACHN.

La figura 5 es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo clonogénico de muerte de toxina mediada por anticuerpo anti-TIM-1 monoclonal en la línea celular de cáncer de mama BT549.

- 40 La figura 6 es una gráfica de barra de los resultados de un ensayo clonogénico de células CAKI-1 tratadas con anticuerpos conjugados con Auristatina E (AE).

La figura 7 es una gráfica de barras de los resultados de un ensayo clonogénico de células BT549 tratadas con anticuerpos conjugados con Auristatina E (AE).

- 45 La figura 8 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 2.59.2, 2.56.2, y 2.45.1 inhiben significativamente la liberación de IL-4 de células Th1 en comparación con el control PK16.3 mAb.

La figura 9 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpo monoclonales anti-TIM-1 2.59.2 y 2.45.1 inhiben significativamente la liberación de IL-4 a partir de células Th2 en comparación con el control PK16.3 mAb.

La figura 10 es una gráfica de barras que muestra que un anticuerpo monoclonal anti-TIM-1 2.59.2 inhibió significativamente la liberación de IL-5 a partir de células Th1 en comparación con el control PK16.3 mAb.

La figura 11 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 2.59.2 y 1.29 inhibieron significativamente la liberación de IL-5 a partir de células Th2 en comparación con el control PK16.3 mAb.

5 La figura 12 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 2.59.2, 1.29 y 2.56.2 inhibieron significativamente la liberación de IL-10 a partir de células Th1 en comparación con el control PK16.3 mAb.

10 La figura 13 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 2.59.2, 1.29 y 2.45.1 inhibieron significativamente la liberación de IL-10 a partir de células Th2 en comparación con el control PK16.3 mAb.

La figura 14 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 2.59.2, 1.29 y 2.56.2 inhibieron significativamente la liberación de IL-13 a partir de células Th1 en comparación con el control PK16.3 mAb.

15 La figura 15 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 2.59.2 y 1.29 inhibieron significativamente la liberación de IL-13 a partir de células Th2 en comparación con el control PK16.3 mAb.

La figura 16 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 no inhibieron la liberación de IFN γ a partir de células Th1 en comparación con el control PK16.3 mAb.

20 La figura 17 es una gráfica de barras que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 2.59.2 y 2.45.1 inhibieron significativamente la liberación de IFN γ a partir de células Th2 en comparación con el control PK16.3 mAb.

Las figuras 18A-18T son gráficas de barras que muestran los resultados de ensayos de incorporación de BrdU a partir de experimentos en los cuales se estableció la neutralización de diversos anticuerpos monoclonales humanos anti-TIM-1.

25 Las figuras 19A a 19 D son gráficas de línea que muestran los resultados de estudios conjugados de anticuerpos llevados a cabo utilizando la toxina vegetal Saporina conjugada con anticuerpos específicos para TIM-1 y anticuerpos irrelevantes (figuras 19A-19C). Controles negativos adicionales incluyeron anticuerpos irrelevantes solos sin toxina (figura 19D).

Descripción detallada de la realización preferida

30 Las realizaciones de la invención descritas aquí se basan en la generación e identificación de anticuerpos aislados que se enlazan específicamente al dominio de inmunoglobulina y dominio de 1 mucina de células T (TIM-1). Como se discute más abajo, la TIM-1 se expresa a niveles elevados en carcinomas celulares limpios y líneas celulares de cáncer derivadas de los mismos. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos que se enlazan a TIM-1 son útiles para el tratamiento e inhibición de carcinomas. Además, los anticuerpos que se enlazan a TIM-1 también son útiles para reducir la migración celular y potenciar la apoptosis de células cancerosas de riñón.

35 De acuerdo con lo anterior, la invención provee un anticuerpo humano aislado o un fragmento de enlazamiento del mismo que se une específicamente al dominio de inmunoglobulina y dominio 1 de mucina de células T (TIM-1), en donde dicho anticuerpo o fragmento de enlazamiento tiene un polipéptido de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y un polipéptido de cadena liviana que comprende tres CDRs, en donde los tres CDRs de cadena pesada y los tres CDRs de cadena liviana son seleccionados de:

40 (a) un CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos GFIFSRYGMH, un CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos VIWYDGSNKLYADSVK, una cadena CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDNSRHHWGFYD, una cadena CDR1 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos RSSRLLDSDDGNTYLD, una cadena CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos TLSYRAS, y una cadena CDR3 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos MQRVEFPIT; y

45 (b) una cadena CDR1 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSISSDGYYS, una cadena CDR2 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos YIYSGSTFYNP SLKS, una cadena CDR3 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ESPHSSNWYSGFDC, una cadena CDR1 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSIG SRLH, una cadena CDR2 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos

50

YASQSFS, y una cadena CDR3 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos HQSSNLPFT.

Como es sabido en el arte, los anticuerpos pueden ser ventajosamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, quiméricos y/o humanos. Las realizaciones de la invención descritas aquí también proveen células para producir estos anticuerpos.

5 Otra realización de la invención provee estos anticuerpos y fragmentos de enlazamiento para uso en una medicina. Por ejemplo, las realizaciones de la invención proveen los anticuerpos y fragmentos de enlazamiento para uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica incluyendo cáncer o tumor. Preferiblemente, los anticuerpos son usados para tratar neoplasmas tales como tumores renales y pancreáticos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer gástrico (estómago), melanoma, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer esofágico y cáncer de cerebro. En una realización preferida, la invención provee el anticuerpo o fragmento de enlazamiento para uso en el tratamiento de cáncer renal. En asociación con tal tratamiento, se proveen artículos de manufactura que comprenden estos anticuerpos. Adicionalmente, se provee un kit de ensayo que comprende estos anticuerpos para cribar cánceres renales o tumores.

15 Adicionalmente, los ácidos nucleicos descritos aquí, y fragmentos y variantes de los mismos, pueden ser utilizados, a manera de ejemplo no limitante, (a) para dirigir la biosíntesis de las proteínas, polipéptidos, fragmentos y variantes codificados correspondientes como productos genéticos recombinantes o heterólogos, (b) como sondas para la detección y cuantificación de los ácidos nucleicos divulgados aquí, (c) como plantillas de secuencia para preparar moléculas antisentido, y similares. Tales usos se describen de manera más completa en la siguiente divulgación.

20 Adicionalmente, las proteínas y polipéptidos TIM-1 descritos aquí, y fragmentos y variantes de los mismos, pueden ser utilizados, en maneras que incluyen (a) servir como inmunogén para estimular la producción de un anticuerpo anti-anti-TM1, (b) un antígeno de captura en un ensayo inmunogénico para tal anticuerpo, (c) como objetivo para criba de sustancias que se enlazan a un polipéptido de TIM-1 descrito aquí, y (d) un objetivo para un anticuerpo específico de TIM-1 de tal manera que el tratamiento con el anticuerpo afecta la función molecular y/o celular mediada por el objetivo. La expresión o actividad del polipéptido de TIM-1 puede promover la supervivencia celular y/o al potencial metastásico. Por el contrario, un descenso en la expresión del polipéptido de TIM-1 o inhibición de su función reduce la supervivencia de las células tumorales e invasividad de una manera terapéuticamente beneficiosa.

25 Los anticuerpos de cadena sencilla (scFv's) y anticuerpos biespecíficos que son específicos para TIM-1 son útiles particularmente por que pueden penetrar de manera más fácil una masa tumoral debido a su tamaño más pequeño con respecto a una molécula de IgG completa. Los estudios que comparan la penetración tumoral entre moléculas de IgG enteras y scFv's han sido descritos en la literatura. Los scFv pueden ser derivados con una toxina o radionúclido con el fin de destruir células tumorales que expresan el antígeno TIM-1, de una manera similar a la toxina anti-TIM-1 para IgG2 o IgG4 marcada o derivada con radionúclido cuyos anticuerpos ya se discutieron, pero con la ventaja de ser capaz de penetrar el tumor de manera más completa, lo cual puede traducirse en una eficacia incrementada en la erradicación del tumor. Un ejemplo específico de un scFv anti-TIM-1 biológicamente activo se provee aquí.

Listado de secuencias

40 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada y cadena liviana de anticuerpos anti-TIM-1 humanos se proveen en el listado de secuencias, cuyo contenido se resume en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
1.29	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	1
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	2
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	3
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	4

ES 2 557 769 T3

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
1.37	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	5
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	6
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	7
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	8
2.16	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	9
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	10
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	11
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	12
2.17	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	13
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	14
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	15
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	16
2.24	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	17
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	18
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	19
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	20
2.45	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	21
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	22
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	23
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	24
2.54	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	25
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	26
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	27
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	28
2.56	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	29
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	30
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	31
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	32

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
2.59	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	33
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	34
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	35
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	36
2.61	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	37
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	38
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	39
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	40
2.70	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	41
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	42
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	43
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	44
2.76	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	45
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	46
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	47
	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana	48
2.70.2	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	49
	Secuencia de aminoácidos de la región variable y una porción de la región constante de la cadena pesada	50
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	51
	Secuencia de aminoácidos de la región variable y una porción de la región constante de la cadena liviana	52

Definiciones

5 A menos que se defina otra cosa, los términos científicos y técnicos usados en relación con la invención descrita aquí tendrán los significados que son entendidos comúnmente por las personas de experiencia normal en el arte. Adicionalmente, a menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán los singulares. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y de tejidos, biología molecular, y química e hibridación de proteína y oligo o polinucleótidos descritos aquí son aquellos bien conocidos y utilizados de manera común en el arte. Las técnicas estándar son usadas para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con especificaciones de los fabricantes o como se conducen comúnmente en el arte o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores se ejecutan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas a lo largo de la presente especificación. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 d. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)). Las

10

15

nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos aquí son aquellos bien conocidos y utilizados de manera común en el arte. Se usan técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

5 Tal como se utilizan de acuerdo con la presente divulgación, los términos siguientes, al menos que se indique otra cosa, serán entendidos por tener los siguientes significados:

El término "TIM-1" se refiere al dominio de inmunoglobulina y dominio 1 de mucina de células T. En una realización, TIM-1 se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

10 El término "polipéptido" se utiliza aquí como un término genérico para referirse a una proteína, fragmentos o análogos de una secuencia de polipéptidos naturales. Por lo tanto, proteína, fragmentos y análogos naturales son especies del género de los polipéptidos. Polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención comprenden moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana kappa humanas, así como moléculas de anticuerpos formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana, tales como las moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana kappa, y viceversa, así como fragmentos y análogos de las mismas.

15 El término "polinucleótido" tal como se cita aquí significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, bien sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de cadena sencilla y doble de ADN.

20 El término "polinucleótido aislado" tal como se utiliza aquí significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, el cual por virtud de su origen el polinucleótido aislado (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en el cual el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) está enlazado operativamente a un polinucleótido al cual no está enlazado en la naturaleza, (3) no se presenta en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

25 El término "proteína aislada" citado aquí significa una proteína de ADNc, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, la cual en virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas murínicas, (3) es expresada por una célula a partir de especies diferentes, o (4) no se presenta en la naturaleza.

30 El término "oligonucleótido" citado aquí incluye nucleótidos de origen natural y modificados enlazados entre sí por enlaces oligonucleótido de origen natural y de origen no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden en general una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente los oligonucleótidos tiene 10 a 60 bases de longitud y lo más preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos usualmente son de cadena sencilla, por ejemplo, para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden tener cadena doble, por ejemplo, para el uso en la construcción de un mutante genético.

35 Los oligonucleótidos descritos aquí pueden ser oligonucleótidos en sentido o antisentido.

40 De la misma forma, a menos que se especifique otra cosa, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótidos de cadena doble se denomina como la dirección 5'. La dirección de adición de 5'a 3'de transcritos de ARN nacientes se denomina como la dirección de transcripción; las regiones de secuencia sobre la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' con respecto al extremo 5' del transcritos de ARN se denominan como secuencias corriente arriba; las regiones de secuencia de la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ADN y que van de 3' al extremo de 3' del transcritos de ARN se denominan como secuencias corriente abajo.

45 El término "de origen natural" tal como se utiliza aquí según se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede ser encontrado en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede ser aislada de una fuente de la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de alguna otra manera es de origen natural.

50 El término "nucleótidos de origen natural" citados aquí incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" citado aquí incluyen nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces de oligonucleótido" citados aquí incluyen enlaces oligonucleótido tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares véase, por ejemplo LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman, Chemical

Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para detección si se desea.

El término “enlazado operativamente” tal como se utiliza aquí se refiere a posiciones de componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Una secuencia de control enlazado operativamente a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se alcanza bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término “secuencia de control” tal como se utiliza aquí se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias de codificación a las cuales están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en los procariotas, tales secuencias de control incluyen en general promotor, sitio de enlazamiento ribosómico y secuencia de terminación de la transcripción; en los eucariotas, en general, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término secuencias de control pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y pueden incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias de guía y secuencias de asociados de fusión.

El término “hibrida selectivamente” citado aquí significa enlazarse de manera detectable y específicamente. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos descritos aquí hibridan selectivamente a cadenas de ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de enlazamiento detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden utilizarse condiciones de alta restricción para alcanzar condiciones de hibridación selectivas como es sabido en el arte y se discute aquí. En general, la homología de secuencia de ácidos nucleicos entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos descritos aquí y una secuencia de ácidos nucleicos de interés será de al menos 80%, y más típicamente con homologías preferiblemente crecientes de al menos 85%, 90%, 95%, 99% y 100%.

Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, un 85% de homología significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias son alineadas para una coincidencia máxima. Las brechas (en cualquiera de las dos secuencias que están siendo comparadas) se permiten en la maximización de la coincidencia; longitudes de brecha de 5 o menos son preferidas siendo 2 o menos más preferidas. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteínas (o secuencias de polipéptidos derivados de ellas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, en cuanto este término es utilizado aquí, si tienen una calificación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación estándar) utilizando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalidad de brecha de 6 o mayor. Véase Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Suplemento 2 a este volumen, pp.1-10. Las dos secuencias o partes de la misma son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son mayores que o iguales al 50% idénticos cuando se alinean de manera óptima utilizando el programa ALIGN.

El término “corresponde a” se utiliza aquí para indicar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (esto es, es idéntica, y no estrictamente relacionada evolutivamente) a toda o a una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptidos es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia.

En contradistinción, el término “complementariedad a” se utiliza aquí para indicar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos “TATAC” corresponde a una secuencia de referencia “TATAC” y es complementaria a una secuencia de referencia “GTATA”.

Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencias entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” y “identidad sustancial”. Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida como base para una comparación de secuencias; y una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADNc o secuencia genética de longitud completa dada en un listado de secuencias o puede comprender una secuencia de ADNc o genética completa. En general, una secuencia de referencia tiene al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos de longitud, y frecuentemente al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Puesto que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos pueden cada una (1) comprender una secuencia (esto es, una porción de la secuencia de polinucleótidos o aminoácidos completa) que es similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) moléculas se llevan a cabo típicamente comparando secuencias de las dos moléculas dentro de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una “ventana de comparación”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones contiguas de nucleótidos o 6 aminoácidos en donde una secuencia de polinucleótidos o una secuencia de aminoácidos puede ser comparada con una secuencia de referencia de secuencias de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 secuencias de aminoácidos y en donde la

porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, eliminaciones, sustituciones y similares (esto es, brechas) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o eliminaciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede ser llevado a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 85:2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, o paquetes de software MacVector), o por inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (esto es, que da como resultado el porcentaje más alto de homología sobre la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (esto es, sobre una base de nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) en la ventana de comparación. El término porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales las bases de ácidos nucleicos (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o residuos idénticos ocurren en ambas secuencias para generar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (esto es, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para generar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal como se utiliza aquí denota una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más usualmente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente sobre una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia a la secuencia que puede incluir eliminaciones o adiciones la cual es 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Tal como se utiliza aquí, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos descritos aquí. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, y -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada aquí, la dirección hacia la mano izquierda es la dirección amino terminal y la dirección a la mano derecha es la dirección carboxi terminal, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

Tal como se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptidos, cuando se alinean de manera óptima, por ejemplo mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de brecha por sistema, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia y lo más preferiblemente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tiene similares cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales hidroxil-alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustituciones conservadoras en aminoácidos preferidas son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

Tal como se discute aquí, variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina se contemplan como abarcadas por la invención descrita aquí, con la condición de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantiene al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, 90%, 95% y los más preferiblemente 99% de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina descritos aquí. En particular, se contemplan reemplazos conservadores de aminoácidos. Los reemplazos

conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen en general en familias: (1) ácidos=aspartato, glutamato; (2) básicos=lisina, arginina, histidina; (3) no polares=alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados=glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Familias más preferidas son: serina y treonina son familia hidroxialifática; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y fenilalanina, triptófano y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto mayor sobre el enlazamiento o proteínas de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no involucra un aminoácido dentro de un sitio de marco. Si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional puede determinarse fácilmente probando la actividad específica derivado del polipéptido. Se describen aquí ensayos en detalle. Los fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina pueden ser preparados fácilmente por los de experiencia normal en el arte. Terminales amino y carboxi preferidas de los fragmentos análogos se presentan cerca a las fronteras de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden ser identificados por comparación de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferiblemente, se usan métodos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencias o predecir dominios de conformación de proteínas que se presentan en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie et al., *Science*, 253:164 (1991). Así, los ejemplos anteriores demuestran que las personas de experiencia normal en el arte pueden reconocer los motivos de secuencia y las conformaciones estructurales que pueden ser utilizados para definir los dominios estructurales y funcionales descritos aquí.

Sustituciones preferidas de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reduce la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de enlazamiento para la formación de complejos proteínicos, (4) alteran las afinidades de enlazamiento, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia diferente a la secuencia de péptidos de origen natural. Por ejemplo, sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservadoras) pueden hacerse en la secuencia de origen natural (preferiblemente en la porción del polipéptido por fuera de los contactos intermoleculares que forman dominios). Una sustitución de aminoácidos conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que se presenta en la secuencia original, o perturbar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en el arte están descritas en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al., *Nature*, 354:105 (1991).

El término "fragmento de polipéptido" tal como se utiliza aquí se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero en donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos típicamente tienen al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, usualmente al menos 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud. El término "análogos" tal como se utiliza aquí se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial a una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que al menos tiene una de las siguientes propiedades: (1) enlazamiento específico a un TIM-1, bajo condiciones de enlazamiento adecuadas, (2) capacidad para bloquear un enlazamiento de TIM-1 apropiado, o (3) capacidad para inhibir el crecimiento y/o supervivencia de células que expresan TIM-1 *in vivo* o *in vitro*. Típicamente, los análogos de polipéptidos comprenden una sustitución de aminoácidos conservadora (o adición o eliminación) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos típicamente tienen al menos 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más, y frecuentemente son tan largos como un polipéptido de origen natural de longitud completa.

Los análogos de péptidos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las de los péptidos de plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan imitadores de péptidos o peptidomiméticos. Fauchere, J. *Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); Veber and Freidinger, *TINS*, p.392 (1985); and Evans et al., *J. Med. Chem.*, 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan comúnmente con la ayuda de modelación molecular computarizada. Los imitadores de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden ser utilizados para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (esto es, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo consistente de: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--,-CH=CH--(cis y trans), --COCH₂--,-CH(OH)CH₂--,- y --CH₂SO--, por métodos

5 conocidos en el arte. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede utilizarse para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados por métodos conocidos en el arte (Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem., 61:387 (1992); por ejemplo, agregando residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclizan el péptido.

10 "Anticuerpo" o "péptidos de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto, o a un fragmento de enlazamiento del mismo que compite con el anticuerpo intacto para el enlazamiento específico. Los fragmentos de enlazamiento son producidos por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de enlazamiento incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, y anticuerpos de cadena sencilla. Un anticuerpo diferente a un anticuerpo biespecífico o bifuncional se entiende que tiene cada uno de sus sitios de enlazamiento idénticos. Un anticuerpo sustancialmente inhibe la adhesión de un receptor a un contrarreceptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor enlazado al contrarreceptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60% u 80%, y más usualmente mayor de aproximadamente 85% (según se mide en un ensayo de enlazamiento competitivo *in vitro*).

20 La digestión de los anticuerpos con la enzima, papaína, da como resultado dos fragmentos de enlazamiento a antígeno idénticos, también conocidos como fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de enlazamiento a antígeno pero que tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de los anticuerpos con la enzima, pepsina, da como resultado el fragmento "F(ab')₂" en el cual los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen enlazados y comprenden dos sitios de enlazamiento a antígeno. El fragmento F(ab')₂ tiene la capacidad de entrecruzarse con el antígeno.

"Fv" cuando se utiliza aquí se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que retiene los sitios tanto de reconocimiento de antígeno como de enlazamiento a antígeno.

25 "Fab" cuando se utiliza aquí se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena liviana y el dominio CH1 de la cadena pesada.

30 El término "epitopo" incluye cualquier determinante proteínico capaz de enlazarse específicamente a una inmunoglobulina o a un receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten usualmente de agrupamientos de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y usualmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se enlaza específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es símbolo de $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$ y los más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$.

El término "agente" se utiliza aquí para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho a partir de materiales biológicos.

35 El término "agente farmacéutico" o "fármaco" tal como se utiliza aquí se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente. Otros términos químicos son usados aquí de acuerdo con el uso convencional en el arte, tal como se puede ver por ejemplo en The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

40 El término "agente antineoplásico" se utiliza aquí para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir un desarrollo o progresión de un neoplasma en un humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma, o leucemia. La inhibición de la metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

45 Tal como se utiliza aquí, "sustancialmente pura" significa una especie objetivo que es la especie predominante presente (esto es, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objetivo comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente 85%, 90%, 95% y 99%. Lo más preferiblemente, la especie objetivo es purificada hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden ser detectadas en la composición por métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente de una especie macromolecular.

50 "Activo" o "actividad" con respecto a un polipéptido TIM-1 se refiere a una porción de un polipéptido TIM-1 la cual tiene una actividad biológica o inmunológica de un polipéptido TIM-1 natural. "Biológica" cuando se utiliza aquí se refiere a una función biológica que es el resultado de la actividad del polipéptido TIM-1 natural. Una actividad

biológica preferida incluye, por ejemplo, la regulación del crecimiento celular.

5 “Marcador” o “marcado” tal como se usa aquí se refiere a la adición de una unidad estructural detectable a un polipéptido, por ejemplo, un radiomarcador, un marcador fluorescente, un marcador enzimático quimioluminiscente marcado o un grupo biotínico. Radioisótopos o radionúclidos pueden incluir ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , los marcadores fluorescentes pueden incluir rodamina, fósforos lantánidos o FITC y marcadores enzimáticos pueden incluir peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina.

“Mamífero” cuando se utiliza aquí se refiere a cualquier animal que se considera un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es humano.

10 “Liposoma” cuando se utiliza aquí se refiere a una pequeña vesícula que puede ser útil para administrar fármacos que pueden incluir el polipéptido TIM-1 descrito aquí o anticuerpos para tal polipéptido TIM-1 a un mamífero.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios.

Estructura del anticuerpo

15 La unidad estructural de anticuerpo completo básico es conocida por comprender un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “liviana” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La porción terminal amino de cada cadena incluye un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables primariamente del reconocimiento de antígenos. La porción terminal carboxi de cada cadena define una región constante responsable primariamente por la función efectora. Las cadenas livianas humanas son clasificadas como cadenas livianas kappa y lambda. Las cadenas pesadas humanas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o 20 épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes son unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región “D” de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase en general, *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2d ed. Ravens Press, N.Y. (1989)).

Las regiones variables de cada par de cadenas liviana/pesada forman el sitio de enlazamiento del anticuerpo.

25 Los dominios variables exhiben todos la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDRs. Las CDRs de las cadenas pesada y liviana de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo un enlazamiento a un epitopo específico. A partir del terminal N hacia el terminal C, ambas cadenas liviana y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada región está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

35 Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/liviana diferentes y dos sitios de enlazamiento diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos por una variedad de métodos incluyendo fusión de hibridomas o enlazamiento de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Los anticuerpos biespecíficos no existen en la forma de fragmentos que tienen un sitio de enlazamiento individual (por ejemplo, Fab, Fab', y Fv).

40 Será evidente que tales anticuerpos bifuncionales o biespecíficos están contemplados y abarcados por la invención. Un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico con especificidad a TIM-1 y al antígeno CD3 sobre linfocitos T citotóxicos puede ser utilizado para dirigir estas células T a células tumorales que expresan TIM-1 y producir apoptosis y erradicación del tumor. Se describen aquí dos constructos scFv biespecíficos para este propósito. Los componentes scFv específicos para TIM-1 pueden ser derivados de anticuerpos anti-TIM-1 descritos aquí.

45 Los componentes de anticuerpo anti-TIM-1 divulgados en las Tablas 4 y 5 pueden ser utilizados para generar un scFv biológicamente activo dirigido contra TIM-1. En una realización preferida, los componentes scFv son derivados de mAb 2.70. El componente scFv anti CD3 del scFv biespecífico terapéutico fue derivado a partir de una secuencia depositada en Genbank (número de acceso CAE85148). Los anticuerpos alternativos conocidos por apuntar a CD3 u otros antígenos de células T pueden ser efectivos de manera similar en el tratamiento de enfermedades malignas cuando se acoplan con un anti-TIM-1, bien sea en un esqueleto de cadena sencilla o en una IgG completa.

50 Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

La invención provee anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos aislados.

Los anticuerpos humanos evitan ciertos problemas asociados con los anticuerpos que poseen regiones murínicas o variables y/o constantes de rata. La presencia de tales proteínas murínicas o derivadas de rata pueden llevar a la eliminación rápida de los anticuerpos o puede llevar a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo por un mamífero diferente a un roedor.

5 Anticuerpos humanos

La capacidad de clonar y reconstruir loci humanos de tamaño de megabase en YACs y de introducirlos en la línea germinal de ratón provee una metodología poderosa para dilucidar los componentes funcionales de loci mapeados de manera muy grande o crudamente así como para generar modelos útiles de enfermedad humana. Una aplicación práctica importante de tal estrategia es la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los cuales los genes Ig endógenos han sido inactivados ofrece la oportunidad de desarrollar anticuerpos humanos en el ratón. Se espera que anticuerpos humanos completos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas para ratones o Mabs derivados de ratones y así incrementar la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados a humanos. Se puede esperar que el uso de anticuerpos humanos completos provea una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad, y cáncer que requieren administraciones de anticuerpos repetidas.

Una metodología hacia esta meta fue diseñar cepas de ratones deficientes en producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes de loci de Ig humana en anticipación de que tales ratones produjeran un repertorio grande de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Esta estrategia en general fue demostrada en conexión con nuestra generación de las primeras cepas Xenomouse[®] tal como se publicó en 1994. Véase Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994). Las cepas Xenomouse[®] fueron diseñadas con cromosomas artificiales de levadura (YACs) que contenían fragmentos de configuración de líneas germinales con tamaños de 245 kb y 190 kb de locus de cadena pesada humana y locus de cadena liviana kappa, respectivamente, los cuales contenían secuencias variables centrales y de región constante. *Id.* Las cepas de XENOMOUSE[®] están disponibles en Abgenix, Inc. (Fremont, CA). Más de aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humano ha sido introducido a través de la introducción de fragmentos de YAC de configuración de línea germinal de tamaño de megabase de los loci de cadena pesada humana y de los loci de cadena liviana kappa, respectivamente, a ratones Xenomouse[®] producidos.

La producción del XENOMOUSE[®] está discutida adicionalmente y delineada en la Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Series Nos. 07/466,008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610,515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919,297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922,649, presentada el 30 de julio de 1992, presentada 08/031,801, presentada en marzo 15, 1993, 08/112,848, presentada en agosto 27, 1993, 08/234,145, presentada en abril 28, 1994, 08/376,279, presentada en enero 20, 1995, 08/430, 938, En abril 27, 1995, 08/464,584, presentada en junio 5, 1995, 08/464,582, presentada en junio 5, 1995, 08/463,191, presentada en junio 5, 1995, 08/462,837, presentada en junio 5, 1995, 08/486,853, presentada en junio 5, 1995, 08/486,857, presentada en junio 5, 1995, 08/486,859, presentada en junio 5, 1995, 08/462,513, presentada en junio 5, 1995, 08/724,752, presentada octubre 2, 1996, y 08/759,620, presentada en diciembre 3, 1996 y Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181, y 5,939,598 y las Patentes Japonesas Nos. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, y 3 068 507 B2. Véase también Méndez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997) and Green and Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998). Véase también la Patente Europea No. EP 0 463 151 B1, con concesión publicada el 12 de junio de 1996, la Solicitud Internacional de Patente No., WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la Solicitud Internacional de Patente No., WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, la WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, la WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000.

Metodologías alternativas han utilizado una metodología de "minilocus", en la cual un locus Ig exógeno es mimetizado a través de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus Ig. Así, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) son formadas en un constructo para inserción en un animal. Esta metodología está descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 5,545,807 de Surani et al. y Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299, y 6,255,458 cada una de Lonberg y Kay, Patente de los Estados Unidos No. 5,591,669 y 6,023,010 de Krimpenfort y Berns, Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,612,205, 5,721,367, y 5,789,215 de Berns et al., y Patente de los Estados Unidos No. 5,643,763 de Choi y Dunn, y GenPharm International Solicitud de Patente de los Estados Unidos Series Nos. 07/574,748, presentada en agosto 29, 1990, 07/575,962, presentada en agosto 31, 1990, 07/810,279, presentada en diciembre 17, 1991, 07/853,408, presentada en marzo 18, 1992, 07/904,068, presentada en junio 23, 1992, 07/990,860, presentada en diciembre 16, 1992, 08/053,131, presentada en abril 26, 1993, 08/096,762, presentada en julio 22, 1993, 08/155,301, presentada en noviembre 18, 1993, 08/161,739, presentada en diciembre 3, 1993, 08/165,699, presentada en diciembre 10, 1993, 08/209,741, presentada en marzo 9, 1994.

Véase también la Patente Europea No. 0 546 073 B1, Solicitudes Internacionales de Patente Nos. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO

97/13852, y WO 98/24884 y Patente de los Estados Unidos No. 5,981,175.

Véase adicionalmente Taylor *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1993, Tuailon *et al.*, 1993, Choi *et al.*, 1993, Lonberg *et al.*, (1994), Taylor *et al.*, (1994), y Tuailon *et al.*, (1995), Fishwild *et al.*, (1996).

5 A la vez que los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murínica, se espera que ciertas respuestas de anticuerpos antiquiméricos humanos (HACA) sean observadas, particularmente en usos crónicos o de dosis múltiples del anticuerpo. Así, sería deseable proveer anticuerpos completamente humanos contra TIM-1 con el fin de viciar las preocupaciones y/o efectos de la respuesta de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) o HACA.

Tecnologías de humanización y despliegue

10 Los anticuerpos con inmunogenicidad reducida pueden ser generados utilizando técnicas de humanización y despliegue de biblioteca. Será evidente que los anticuerpos pueden ser humanizados o primatizados utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Winter y Harris, *Immunol Today* 14:43-46 (1993) y Wright *et al.*, *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede ser manipulado por técnicas de ADN recombinantes para sustituir los dominios bisagra CH1, CH2, CH3, y/o el dominio de marco con la correspondiente secuencia humana (véase WO 92/02190 y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,530,101, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,792, 5,714,350, y 5,777,085). También, el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos es conocido en el arte (Liu *et al.*, P.N.A.S 84:3439 (1987) y J. *Immunol.* 139:3521 (1987)). El ARNm es aislado a partir de un hibridoma u otra célula que produce el anticuerpo y es utilizado para producir ADNc. El ADNc de interés puede ser amplificado por la reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores específicos (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,195 y 4,683,202). Alternativamente, una biblioteca de expresiones hecha y cribada para aislar la secuencia de interés que codifica la región variable del anticuerpo y es fusionada luego a secuencias de región constante humanas. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas pueden encontrarse en Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," N.I.H. publication no. 91-3242 (1991). Los genes de la región C humana son fácilmente disponibles a partir de clones conocidos. La selección del isotipo será guiada por las funciones efectoras deseadas, tal como fijación de complementos, o la actividad en una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Isotipos preferidos son IgG1, IgG2 e IgG4. Cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humanas, kappa o lambda, pueden ser usadas. El anticuerpo humanizado quimérico es expresado entonces por métodos convencionales. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YACs, episomas derivados de EBV y similares.

30 Los fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab pueden ser preparados por escisión de la proteína intacta, por ejemplo, por escisión por proteasa o química. Alternativamente, se designa un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido por un codón de detención de traducción para generar la molécula truncada.

35 Las secuencias de consenso de las regiones J H y L pueden ser utilizadas para diseñar oligonucleótidos para uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para enlazamiento subsecuente de segmentos de la región V a segmentos de la región C humana. El ADNc de la región C puede ser modificado por mutagénesis dirigida al sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

40 Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YACs, episomas derivados de EBV y similares. Un vector conveniente es aquel que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados manipulados de tal manera que las secuencias VH o VL pueden ser insertadas y expresadas fácilmente. En tales vectores, el empalme ocurre usualmente entre el sitio donante de empalme en la región J insertada y el sitio de aceptación de empalme precedente a la región C humana, y también en las regiones de empalme que se presentan dentro de los exones CH humanos. La terminación de la poliadenilación y la transcripción ocurren en sitios cromosómicos naturales corriente abajo de las regiones de codificación. El anticuerpo quimérico resultante puede ser unido a cualquier promotor fuerte, incluyendo LTRs retrovirales, por ejemplo, el promotor temprano SV-40 (Okayama *et al.*, *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983)), LTR del virus de sarcoma Rous (Gorman *et al.*, P.N.A.S. 79:6777 (1982)), y LTR del virus de leucemia murínica Moloney (Grosschedl *et al.*, *Cell* 41:885 (1985)). También, tal como será evidente, pueden utilizarse promotores lg naturales y similares.

50 Adicionalmente, los anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies pueden ser generados a través de técnicas de tipo despliegue, incluyendo, sin limitación, despliegue de fagos, despliegue retroviral, despliegue ribosómico, y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en el arte y las moléculas resultantes pueden ser sometidas a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, técnicas tales que son bien conocidas en el arte. Wright y Harris, *supra.*, Hanes y Plutchau, *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (ribosomal display), Parmley and Smith, *Gene* 73:305-318 (1988) (phage display), Scott, *TIBS* 17:241-245 (1992), Cwirla *et al.*, *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990), Russel *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom *et al.*, *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty, *TIBTECH* 10:80-84 (1992), y la Patente de los Estados Unidos No. 5,733,743. Si se

utilizan tecnologías de despliegue para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos pueden ser humanizados como se describió más arriba.

5 Utilizando estas técnicas, pueden generarse anticuerpos a células que expresan TIM-1, TIM-1 misma, formas de TIM-1, epítomos o péptidos del mismo, y bibliotecas de expresión para el mismo (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,703,057), los cuales pueden ser luego cribados, tal como se describió más arriba para las actividades descritas más arriba.

Agentes terapéuticos anticuerpo

10 En ciertos aspectos, puede ser deseable en conexión con la generación de anticuerpos como candidatos terapéuticos contra TIM-1 que los anticuerpos sean capaces de fijar complementos y participar en citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Tales anticuerpos incluyen, sin limitación, lo siguiente: IgM murínica, IgG2a murínica, IgG2b murínica, IgG3 murínica, IgM humana, IgG1 humana e IgG3 humana. Será evidente que los anticuerpos que son generados no necesitan poseer inicialmente tal isotipo, sino que, en vez de ello, el anticuerpo tal como es generado puede poseer cualquier isotipo y el anticuerpo puede ser un isotipo conmutado después de utilizar técnicas convencionales que son bien conocidas en el arte. Tales técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,397), técnicas de fusión célula-célula (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,916,771 y 6,207,418), entre otros.

En la técnica de fusión célula-célula, se prepara un mieloma u otra línea celular que posee una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y otro mieloma o se prepara otra línea celular que posee la cadena liviana. Tales células, después de esto, pueden ser fusionadas y puede aislarse una línea celular que expresa un anticuerpo intacto.

20 A manera de ejemplo, el anticuerpo TIM-1 discutido aquí es un anticuerpo de IgG2 humano anti-TIM-1. Si tal anticuerpo poseyera el enlazamiento deseado a la molécula de TIM-1, podría ser conmutado en isotipo fácilmente para generar un isotipo IgM humano, IgG1 humano o IgG3 humano, a la vez que posee la misma región variable (la cual define la especificidad del anticuerpo y una parte de su afinidad). Tal molécula sería entonces capaz de fijar un complemento y participar en CDC.

25 Diseño y generación de otros agentes terapéuticos

Debido a su asociación con tumores renales y pancreáticos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer gástrico (estómago), melanoma, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer esofágico y cáncer de cerebro, la invención contempla y abarca agentes antineoplásicos que comprenden anticuerpos anti-TIM-1.

30 Además, con base en la actividad de los anticuerpos que son producidos y caracterizados aquí con respecto a TIM-1, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de las unidades estructurales anticuerpo. Tales modalidades incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos anticuerpos avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas, y agentes terapéuticos radiomarcados, generación de agentes terapéuticos peptídicos, terapias genéticas, particularmente intracuerpos, agentes terapéuticos antisentido y moléculas pequeñas.

35 En conexión con la generación de agentes terapéuticos anticuerpos avanzados, cuando la fijación de complementos es un atributo deseable, puede ser posible dejar a un lado la dependencia sobre un complemento para la muerte celular a través del uso de biespecíficos, inmunotoxinas, o radiomarcadores, por ejemplo.

40 Por ejemplo, en conexión con anticuerpos biespecíficos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos que comprendan (i) dos anticuerpos uno con una especificidad a TIM-1 y otro a una segunda molécula que son conjugados entre sí, (ii) un anticuerpo individual que tiene una cadena específica para TIM-1 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad a TIM-1 y la otra molécula. Tales anticuerpos biespecíficos pueden ser generados usando técnicas que son bien conocidas por ejemplo, en conexión con (i) y (ii), véase, por ejemplo, Fanger et al., *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) y Wright and Harris, *supra* y en conexión con (iii), véase, por ejemplo, Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992). En cada caso, la segunda especificidad puede hacerse a los receptores de activación de la cadena pesada, incluyendo, sin limitación, CD16 o CD64 (véase, por ejemplo, Deo et al., 18:127 (1997)) o CD89 (véase, por ejemplo, Valerius et al., *Blood* 90:4485-4492 (1997)). Los anticuerpos biespecíficos preparados de acuerdo con lo anterior deberían probablemente matar células que expresan TIM-1, y particularmente aquellas células en las cuales los anticuerpos TIM-1 descritos aquí son efectivos.

50 Con respecto a inmunotoxinas, los anticuerpos pueden ser modificados para actuar como inmunotoxinas utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Vitetta, *Immunol Today* 14:252 (1993). Véase también la Patente de los Estados Unidos No. 5,194,594. En conexión con la preparación de anticuerpos radiomarcados, tales anticuerpos modificados pueden ser preparados fácilmente utilizando técnicas que son bien

conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véase también las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (RE 35,500), 5,648,471, y 5,697,902. Cada una de las inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas probablemente mataría las células que expresa TIM-1, y particularmente aquellas células en las cuales los anticuerpos descritos aquí son efectivos.

En conexión con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de información estructural relacionada con TIM-1 y anticuerpos para el mismo, tales como los anticuerpos descritos aquí (tal como se discute más adelante en conexión con moléculas pequeñas) o criba de bibliotecas de péptidos, pueden generarse péptidos terapéuticos que son dirigidos contra TIM-1. El diseño y criba de agentes terapéuticos peptídicos esta discutido en conexión con Houghten et al., *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten, *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla et al., *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake and Litz-Davis, *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). También pueden prepararse inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas, y de manera similar, en relación con unidades estructurales peptídicas tal como se discutió más arriba en conexión con los anticuerpos.

Asumiendo que la molécula de TIM-1 (o una forma, tal como la variante de empalme o forma alterna) es funcionalmente activa en un proceso de enfermedad, también será posible diseñar agentes terapéuticos genéticos y antisentido para la misma a través de técnicas convencionales. Tales modalidades pueden ser utilizadas para modular la función de TIM-1. En conexión de la misma con los anticuerpos, tal como se describe aquí, se facilita el diseño y uso de ensayos funcionales relacionados con la misma. Un diseño y estrategia para agentes terapéuticos antisentido está discutido en detalle en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 94/29444. Son bien conocidos diseños y estrategias para terapia genética. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas terapéuticas genéticas que involucran anticuerpos podría demostrar ser particularmente ventajoso. Véase, por ejemplo, Chen et al., *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994) y Marasco, *Gene Therapy* 4:11-15 (1997). El diseño general de y las consideraciones relacionadas con los agentes terapéuticos genéticos también se discute en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 97/38137.

También pueden preverse agentes terapéuticos de moléculas pequeñas. Los fármacos pueden ser diseñados para modular la actividad de TIM-1, tal como se describe aquí. El conocimiento desprendido de la estructura de la molécula de TIM-1 y sus interacciones con otras moléculas, tal como se describieron aquí, tales como los anticuerpos descritos aquí, y otros pueden ser utilizados para diseñar de manera racional modalidades terapéuticas adicionales. En este aspecto, pueden utilizarse técnicas racionales para el diseño de fármacos tales como cristalografía de rayos X, modelación molecular ayudada (o asistida) por ordenador (CAMM), relación estructura-actividad cuantitativa o cualitativa (QSAR) y tecnologías similares para focalizar los esfuerzos en el descubrimiento de fármacos. El diseño racional permite la predicción de estructuras proteínicas o sintéticas que pueden interactuar con la molécula o formas específicas de la misma que pueden ser utilizadas para modificar o modular la actividad de TIM-1. Tales estructuras pueden ser sintetizadas químicamente o expresadas en sistemas biológicos. Esta metodología ha sido revisada en Capsey et al., *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). Adicionalmente, pueden diseñarse bibliotecas combinatorias y sintetizarse y usarse en programas de criba, tal como en esfuerzos de criba de alto rendimiento.

Agonistas y antagonistas de TIM-1

Las realizaciones de la invención descritas aquí también son pertinentes a variantes de una proteína de TIM-1 que funciona como agonista (imitador) de TIM-1 o como antagonistas de TIM-1. Pueden generarse variantes de una proteína de TIM-1 por mutagénesis, por ejemplo, mutación en puntos discretos o truncamiento de la proteína de TIM-1. Un agonista de la proteína de TIM-1 puede retener sustancialmente las mismas, o un conjunto de, actividades biológicas de la forma de origen natural de la proteína TIM-1. Un antagonista de la proteína de TIM-1 puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural de la proteína TIM-1, por ejemplo, enlazándose competitivamente a un miembro corriente abajo o corriente arriba de una cascada de señalización celular que incluye la proteína TIM-1. Así, pueden generarse efectos biológicos específicos por tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma de origen natural de la proteína tiene menos efectos laterales en un sujeto con respecto a un tratamiento con la forma de origen natural de la proteína de TIM-1.

La variantes de la proteína de TIM-1 que funcionan como agonistas (imitadores) de TIM-1 o como antagonistas de TIM-1 pueden ser identificados por bibliotecas combinatorias de criba de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncación, de la proteína TIM-1 para actividad agonista o antagonista de proteínas. Por ejemplo, una biblioteca variegada de variantes de TIM-1 es generada por mutagénesis combinatorial al nivel de los ácidos nucleicos y es codificada por una biblioteca de genes variegados. Una biblioteca variegada de variantes de TIM-1 puede ser producida por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias genéticas de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias TIM-1 potencial es expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para despliegue de fago) que contienen el conjunto de secuencias de TIM-1 en ellas. Hay una variedad de métodos que pueden ser usados para producir bibliotecas de variantes de TIM-1 potenciales a partir de una secuencia de

oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia de genes degenerada puede ser llevada a cabo en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintético ligado entonces en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto de genes degenerados permite la provisión, en una mezcla, de todas las moléculas que codifican el conjunto deseado de las secuencias variantes de TIM-1. En el arte se conocen también métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (véase, por ejemplo, Narang, *Tetrahedron* 39:3 (1983); Itakura et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984); Itakura et al., *Science* 198:1056 (1984); Ike et al., *Nucl. Acid Res.* 11:477 (1983).

Anticuerpos radioinmuno e inmunoquimioterapéuticos

La quimioterapia o radioterapia citotóxica del cáncer es limitada por efectos colaterales serios, algunas veces riesgosos para la vida que surgen de la toxicidades para células normales sensibles porque las terapias no son selectivas para las células malignas. Por lo tanto, hay necesidad de mejorar la selectividad. Una estrategia es acoplar los agentes terapéuticos a anticuerpos que reconozcan los antígenos asociados con los tumores. Esto incrementa la exposición de las células malignas a los agentes terapéuticos dirigidos a los ligandos pero reduce la exposición de las células normales al mismo agente. Véase Allen. *Nat. Rev. Cancer* 2(10):750-63 (2002).

El antígeno de TIM-1 no es uno de estos antígenos asociados con tumores, como lo demuestra su expresión específica sobre membranas celulares de células tumorales por FACS e IHC. Por lo tanto, la expresión provee el anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la invención conjugado a un agente terapéutico. Opcionalmente, el agente terapéutico es una toxina o un isótopo radioactivo o un agente quimioterapéutico. Tales conjugados son adecuados para uso como agentes terapéuticos antitumorales.

Los radiomarcadores son conocidos en el arte y han sido usados para radioinmunoconjugados para diagnóstico o uso terapéutico. Ejemplos de radiomarcadores incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo 3H, 14C, 15N, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I, 177Lu, Renio-186, Renio-188, Samario-153, Cobre-64, Escandio-47). Por ejemplo, los radionúclidos que han sido usados en diagnóstico clínico guiado por radioinmunoconjugados incluye, pero no se limitan a: 131 I, 125 I, 123 I, 99 Tc, 67 Ga, así como 111 In. Los anticuerpos también han sido marcados con una variedad de radionúclidos para uso potencial en inmunoterapia dirigida (véase Peirersz *et al.*, 1987). Los conjugados de anticuerpos monoclonales también han sido utilizados para diagnóstico y tratamiento de cáncer (por ejemplo, *Immunol. Cell Biol.* 65:111-125). Estos radionúclidos incluyen, por ejemplo, 188 Re y 186 Re así como 90 Y, y en un grado menor 199 Au y 67 Cu. El I-(131) también ha sido utilizado para propósitos terapéuticos. La Patente de los Estados Unidos No. 5,460,785 provee un listado de tales radioisótopos. Quelantes radioterapéuticos y conjugados del quelante son conocidos en el arte. Véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,831,175, 5,099,069, 5,246,692, 5,286,850, y 5,124,471.

Pueden prepararse agentes inmunorradiofarmacéuticos utilizando anticuerpos anti-TIM-1 utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)), Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, RE 35,500, 5,648,471, y 5,697,902.

Los inmunoconjugados citotóxicos son conocidos en el arte y han sido utilizados como agentes terapéuticos. Tales inmunoconjugados pueden usar, por ejemplo, maytansinoides (Patente de los Estados Unidos No. 6,441,163), inhibidor de la polimerización de tubulina, auristatina (Mohammad et al., *Int. J. Oncol.* 15(2):367-72 (1999); Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21(7):778-784 (2003)), dolastatin derivatives (Ogawa et al., *Toxicol Lett.* 121(2):97-106 (2001); 21(3):778-784), Mylotarg® (Wyeth Laboratories, Philadelphia, PA); maytansinoides (DM1), taxano o mertansina (ImmunoGen Inc.). Las inmunotoxinas que utilizan anticuerpos anti-TIM-1 pueden ser preparadas por técnicas que son bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Vitetta, *Immunol Today* 14:252 (1993); Patente de los Estados Unidos No. 5,194,594.

Pueden generarse anticuerpos biespecíficos usando técnicas que son bien conocidas en el arte, por ejemplo, véase, por ejemplo, Fanger et al., *Immunol Methods* 4:72-81 (1994); Wright and Harris, *supra*; Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992). En cada caso, la primera especificidad es hacia TIM-1, la segunda especificidad puede hacerse hacia los receptores de activación de cadena pesada, incluyendo, sin limitación CD16 o CD64 (véase, por ejemplo, Deo *et al.*, 18:127 (1997)) o CD89 (véase, por ejemplo, Valerius et al., *Blood* 90:4485-4492 (1997)). Los anticuerpos biespecíficos preparados de acuerdo con lo anterior matarían células que expresan TIM-1.

Dependiendo del uso previsto del anticuerpo, esto es, como reactivo diagnóstico o terapéutico, los radiomarcadores son conocidos en el arte y han sido utilizados para propósitos similares. Por ejemplo, radionúclidos que han sido utilizados en diagnóstico clínico incluyen, pero no se limitan a: .sup.131 I, .sup.125 I, .sup.123 I, .sup.99 Tc, .sup.67 Ga, así como .sup.111 In. Los anticuerpos también han sido marcados con una variedad de radionúclidos para uso potencial en inmunoterapia direccionada. Véase Peirersz et al., (1987). También se han utilizado conjugados de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y tratamiento de cáncer. Véase, por ejemplo, *Immunol. Cell Biol.* 65:111-125. Estos radionúclidos incluyen, por ejemplo, .sup.188 Re y .sup.186 Re así como .sup.90 Y, y hasta un menor grado .sup.199 Au and .sup.67 Cu. También se ha utilizado I-(131) para propósitos terapéuticos. La Patente de los Estados Unidos No. 5,460,785 provee un listado de tales radioisótopos.

5 Patentes relacionadas con quelantes radioterapéuticos y conjugados de quelantes son conocidas en el arte. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,831,175 de Gansow está dirigida a quelatos de ácido dietilentiainopentaacético polisustituidos y conjugados de proteínas que contienen del mismo, y métodos para su preparación. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,099,069, 5,246,692, 5,286,850, y 5,124,471 de Gansow también se relacionan con quelatos de DTPA polisustituido.

Las quimioterapias citotóxicas son conocidas en el arte y han sido usadas para propósitos similares. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,441,163 describe el proceso para la producción de conjugados citotóxicos de maytansinoides y anticuerpos. La actividad antitumoral de un inhibidor de la polimerización de tubulina, la auristatina PE, también es conocida en el arte. Mohammad et al., *Int. J. Oncol.* 15(2):367-72 (Aug 1999).

10 Preparación de anticuerpo

En resumen, se inmunizaron líneas Xenomouse® de ratones con proteína de TIM-1, se recuperaron células linfáticas (tales como células B) de los ratones que expresaban anticuerpos y fueron fusionadas con una línea celular tipo mieloides para preparar líneas celulares de hibridoma inmortal, y tales líneas celulares de hibridoma fueron cribadas y seleccionadas para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para TIM-1. Alternativamente, en vez de ser fusionadas a células de mieloma para generar hibridomas, las células B recuperadas, aisladas a partir de líneas inmunizadas de Xenomouse® de ratones, con reactividad contra TIM-1 (determinada por ejemplo por ELISA con la proteína TIM-1-His), fueron aisladas utilizando un ensayo de placa hemolítica específico para TIM-1. Babcook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7843-7848 (1996). En este ensayo, las células objetivo tales como glóbulos rojos de oveja (SRBCs) fueron recubiertas con el antígeno TIM-1. En la presencia de un cultivo de células B que secretan el anticuerpo anti-TIM-1 y complementos, la formación de una placa indica una lisis mediada por TIM-1 específica de las células objetivo. Las células de plasma específicas para el antígeno individual en el centro de las placas fueron aisladas y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo fue aislada a partir de células de plasma individuales.

25 Utilizando PCR con transcriptasa reversa, el ADN que codifica la región variable del anticuerpo secretado fue clonado e insertado en un vector de expresión adecuado, preferiblemente un casete de vector tal como un ADNpc, más preferiblemente el vector de ADNpc que contiene los dominios constantes de cadenas de inmunoglobulina pesada y liviana. El vector generado fue transfectado entonces en células huésped, preferiblemente células CHO, y cultivado en un medio nutritivo convencional modificados según es apropiado para introducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

30 En general, los anticuerpos producidos por las líneas celulares antes mencionadas poseían cadena pesada de IgG2 completamente humanas con cadenas livianas kappa humana. Los anticuerpos poseían altas afinidades, poseyendo típicamente Kds desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-11} M, medido bien sea en fase sólida o en fase de solución. Estos mAbs pueden ser estratificados en grupos o "cestas" con bases en estudios de competición de enlazamiento al antígeno, como se discute más adelante.

35 Tal como será evidente, los anticuerpos, tal como se describen aquí, pueden ser expresados en líneas celulares diferentes a líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican anticuerpos particulares pueden ser utilizadas para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuado. La transformación puede ser por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, el empaquetamiento del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducción de una célula huésped con el virus (o vector) o por procedimientos de transfección conocidos en el arte, tal como se ejemplifican en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, y 4,959,455.

45 El procedimiento de transformación utilizado depende del huésped que va a ser transformado. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son bien conocidos en el arte e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

50 Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en el arte e incluyen principalmente líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo pero no limitándose a células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebe (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y un cierto número de otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan a través de la determinación de cuáles células tienen altos niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de enlazamiento constitutivo a TIM-1.

Administración y formulaciones terapéuticas

- 5 Los compuestos de la invención se formulan de acuerdo con la práctica estándar, por ejemplo preparados en un vehículo portador. El término "portador farmacológicamente aceptable" significa uno o más ingredientes orgánicos o inorgánicos, naturales o sintéticos, con los cuales el protooncogen mutante o la oncoproteína mutante se combina para facilitar su aplicación. Un portador adecuado incluye solución salina estéril aunque otras soluciones estériles y suspensiones estériles isotónicas acuosas y no acuosas conocidas por ser farmacéuticamente aceptables son conocidas para las personas de experiencia normal en el arte. En este aspecto, el término "portador" abarca liposomas y el anticuerpo (véase Chen et al., Anal. Biochem. 227: 168-175 (1995) así como cualquier plásmido y vectores de expresión viral.
- 10 Cualquiera de los polipéptidos novedosos de esta invención puede ser utilizado en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Ácidos y bases adecuados que son capaces de formar sales con los polipéptidos de la presente invención son bien conocidos para los experimentados en el arte, e incluyen ácidos y bases inorgánicas y orgánicas.
- 15 Un compuesto de la invención es administrado a un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva, lo cual significa una cantidad del compuesto que produce resultado medicamente deseable o ejerce una influencia sobre la condición particular que está siendo tratada. Una cantidad efectiva de un compuesto es capaz de mejorar o retardar la progresión de la condición de enfermedad, degenerativa o deteriorada. La cantidad efectiva puede ser determinada sobre una base individual y se basará, en parte, en la consideración de los atributos físicos del sujeto, síntomas que van a ser tratados y resultados buscados. Una cantidad efectiva puede ser determinada por una persona de experiencia normal en el arte empleando tales factores y sin usar más que experimentación de rutina.
- 20 Los compuestos de la invención pueden ser administrados de cualquier manera que sea medicamente aceptable. Esto puede incluir inyecciones, por rutas parenterales tales como intravenosa, intravascular, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural, u otras así como oral, nasal, oftálmica, rectal o tópica. La administración por liberación sostenida también está incluida específicamente en la invención, por medios tales como inyecciones de depósitos o implantes erosionables. La administración localizada se contempla particularmente, por medios tales como administración a través de un catéter a una o más arterias, tal como la arteria renal o un recipiente que hace el suministro a un tumor localizado.
- 25 Anticuerpos anti-TIM-1 biológicamente activos tal como se describen aquí pueden ser utilizados en una preparación o formulación farmacéutica estéril para reducir el nivel de TIM-1 en suero tratando por lo tanto de manera efectiva condiciones patológicas en donde, por ejemplo, el TIM-1 en suero está elevado de manera normal. Los anticuerpos anti-TIM-1 poseen preferiblemente una afinidad adecuada para suprimir de manera potente el TIM-1 al rango terapéutico objetivo, y preferiblemente tiene una duración adecuada de acción para permitir una dosificación infrecuente. Una duración de acción prolongada permitirá programaciones de dosificación menos frecuente y más convenientes por rutas parenterales alternas tales como inyección subcutánea o intramuscular.
- 30 Cuando se utiliza para administración *in vivo*, la formulación de anticuerpos debe ser estéril. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles antes de o después de la liofilización de reconstitución. El anticuerpo ordinariamente estará almacenado en forma liofilizada o en solución. Las composiciones de anticuerpos terapéuticos generalmente son colocadas en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o un vial que tiene un adaptador que permite retirar la formulación, por ejemplo mediante un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.
- 35 La ruta de administración del anticuerpo está en concordancia con métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intratecal, inhalación o intralesión, o por sistemas de liberación sostenida como se apunta más adelante. El anticuerpo se administra preferiblemente de manera continua por infusión o por inyección de bolus.
- 40 Una cantidad efectiva de anticuerpo para ser empleado terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la ruta de administración y la condición del paciente. De acuerdo con lo anterior, se prefiere que el terapeuta titule la dosificación y modifique la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo hasta que se alcanza una dosificación que logre el efecto deseado. El progreso de esta terapia es monitorizado fácilmente mediante ensayos convencionales o mediante los ensayos descritos aquí.
- 45 Los anticuerpos, tal como se describen aquí, pueden ser preparados en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición terapéutica puede ser administrada por vía intravenosa o a través de la nariz o pulmón, preferiblemente como un aerosol líquido o en polvo (liofilizada). La composición también puede ser administrada por vía parenteral o subcutáneamente según se desee. Cuando se administra por vía sistémica, la composición terapéutica debería ser estéril, libre de pirógenos y en una solución parenteralmente aceptable que tenga características adecuadas para pH, isotonicidad y estabilidad. Estas condiciones son conocidas por los experimentados en el arte. En resumen, las formulaciones de dosificación de los compuestos descritos aquí son preparadas para almacenamiento o administración mezclando el compuesto que tiene el grado deseado de pureza
- 50
- 55

- con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables. Tales materiales son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen reguladores tales como TRIS HCL, fosfato, citrato, acetato y otras sales ácidas orgánicas; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos) tales como poliarginina, proteínas tales como albumina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDT; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones tales como surfactantes de sodio y/o no iónicos tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.
- Las composiciones estériles para inyección pueden ser formuladas de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional tal como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed, Lippincott Williams & Wilkens Publishers (2003)). Por ejemplo, la disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o un aceite vegetal de origen natural tal como aceite de sésamo, cacahuete, o algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similar puede ser deseable. Pueden incorporarse reguladores, conservantes, antioxidantes y similares de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.
- Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en la forma de artículos conformados, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) según lo describe Langer et al., J. Biomed Mater. Res., (1981) 15:167-277 y Langer, Chem. Tech., (1982) 12:98-105, o poli(vinylalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, (1983) 22:547-556), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer et al., supra), copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON Depot™ (microesferas inyectables compuestas de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988).
- Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización de las proteínas dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de disulfuros, la estabilización puede alcanzarse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.
- Las composiciones de liberación sostenida también incluyen la preparación de cristales del anticuerpo suspendidos en formulaciones adecuadas capaces de mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones cuando se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen tales anticuerpos se preparan por métodos conocidos per se: Patente de los Estados Unidos No. DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; 142,641; Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324.
- La dosificación de la formulación de anticuerpos para un paciente dado será determinada por el médico tratante teniendo en cuenta diversos factores en consideración conocidos para modificar la acción de los fármacos incluyendo la severidad y tipo de enfermedad, peso, corporal, sexo, dieta, tiempo y ruta de administración, otras medicaciones y otros factores clínicos relevantes. Las dosificaciones terapéuticamente efectivas pueden ser determinadas por métodos tanto *in vitro* como *in vivo*.
- Una cantidad efectiva de los anticuerpos, descritos aquí, para ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la ruta de administración, y la condición del paciente. De acuerdo con lo anterior, se prefiere que el médico titule la dosificación y modifique la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica podría variar desde aproximadamente 0.001mg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados más arriba. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo terapéutico hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. El progreso de esta terapia es monitorizado fácilmente por ensayos convencionales o como se describe aquí.
- Será evidente que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con las composiciones y métodos presentes será administrada con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para proveer transferencia, administración, tolerancia y similares mejorados. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos

(catiónicas o aniónicas) (tales como lipofectinTM), conjugados de ADN, pastas para absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilén glicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en términos y terapias de acuerdo con la presente invención, con la condición de que el ingrediente activo en la formulación no esté inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la ruta de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery: some emerging concepts." J Pharm Sci .89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA JPharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citaciones en ellas para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos para los químicos farmacéuticos.

Se espera que los anticuerpos descritos aquí tengan efecto terapéutico en el tratamiento de síntomas y condiciones resultantes de la expresión de TIM-1.

Los anticuerpos y métodos presentes se relacionan con el tratamiento de síntomas resultantes de la expresión de TIM-1 incluyendo síntomas de cáncer. La invención provee los anticuerpos y fragmentos de enlazamiento para uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo cánceres de pulmón, colon, estómago, riñón, próstata u ovarios.

Uso diagnóstico

Se ha encontrado que el TIM-1 se expresa a niveles muy bajos en riñones normales pero su expresión se incrementa dramáticamente en riñones post-isquémicos. Ichimura et al., J. Biol. Chem. 273(7):4135-42 (1998). Puesto que la tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-TIM-1 muestra tinción positiva de carcinomas renales, de riñón, próstata y ovario (véase más adelante), la sobreexpresión de TIM-1 con respecto a tejidos normales puede servir como un marcador diagnóstico de tales enfermedades.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, pueden ser utilizados para detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de proteínas de TIM-1. Como se anotó más arriba, el anticuerpo está equipado preferiblemente con un marcador detectable, por ejemplo fluorescente, y el enlazamiento puede ser monitorizado por microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en el arte. Estas técnicas son particularmente adecuadas si el gen amplificado codifica una proteína de la superficie celular, por ejemplo, un factor de crecimiento. Tales ensayos de enlazamiento se llevan a cabo como es conocido en el arte.

La detección *in situ* del anticuerpo que se enlaza a la proteína de TIM-1 puede llevarse a cabo, por ejemplo, por microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica. Para este propósito, un espécimen de tejido es retirado del paciente, y se le aplica un anticuerpo marcado, preferiblemente superponiendo el anticuerpo sobre la muestra biológica. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto genético marcador en el tejido examinado. Será evidente para los experimentados en el arte que hay una amplia variedad de métodos histológicos fácilmente disponibles para la detección *in situ*.

35 Mapeo del epítipo

La parte específica del inmunógeno proteínico reconocido por un anticuerpo puede ser determinada probando la reactividad del anticuerpo a partes de la proteína, por ejemplo, una mitad terminal N y terminal C. El fragmento reactivo resultante puede ser disectado adicionalmente, probando consecutivamente partes más pequeñas del inmunógeno con el anticuerpo hasta que se define el péptido reactivo. Se ensayo el mAb 2.70.2 anti-TIM-1 para la reactividad contra péptidos solapados diseñados de la secuencia de antígenos y se encontró que reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos PLPRQNHE (SEQ ID NO: 96) correspondiente a los aminoácidos 189-202 del inmunógeno de TIM-1 (SEQ ID NO: 54). Adicionalmente utilizando una técnica de barrido de alanina, ha sido determinado que el segundo residuo de prolina y la asparagina parecen ser importantes para el enlazamiento de mAb 2.70.2.

Alternativamente, el epítipo que está enlazado por los anticuerpos anti-TIM-1 de la invención puede ser determinado sometiendo el inmunógeno de TIM-1 a SDS-PAGE bien sea en la ausencia o en la presencia de un agente reductor y analizados por inmunotransferencia. El mapeo del epítipo también puede llevarse a cabo utilizando SELDI. Los arreglos SELDI ProteinChip[®] (LumiCyte) se usaron para definir sitios de la interacción proteína-proteína. El antígeno de la proteína de TIM-1 o fragmentos del mismo puede ser capturado específicamente por anticuerpos inmovilizados covalentemente sobre la superficie del arreglo PROTEINCHIP. Los antígenos enlazados pueden ser detectados por un proceso de desorción inducido por láser y analizados directamente para determinar su masa.

El epítipo reconocido por anticuerpos anti-TIM-1 descrito aquí puede ser determinado exponiendo el arreglo PROTEINCHIP a una biblioteca combinatorial de péptidos aleatorios 12-meros desplegados sobre el fago

- 5 Filamentous (New England Biolabs). Los fagos enlazados al anticuerpo son eluidos y luego amplificados y tomados a través de ciclos de enlazamiento y amplificación adicionales para enriquecer la reserva en favor de las secuencias de enlazamiento. Después de tres o cuatro rondas, los clones de enlazamiento individuales son probados adicionalmente por enlazamiento mediante ensayos ELISA para fagos llevados a cabo sobre pozos recubiertos con el anticuerpo y caracterizados por secuenciación de ADN específico de los clones positivos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos llevados a cabo y los resultados alcanzados se proveen para propósitos ilustrativos solamente y no deben considerarse como limitantes sobre la invención descrita aquí.

Ejemplo 1

- 10 Preparación de anticuerpos monoclonales que se enlazan a TIM-1

- 15 El dominio extracelular soluble de TIM-1 fue utilizado como inmunógeno para estimular una respuesta inmune en animales Xenomouse[®]. Un ADN (CG57008-02), que codifica la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de TIM-1 (menos el péptido de señalización de terminal N predicho) fue subclonado al vector de expresión de baculovirus, pMelV5His (Curagen Corp., New Haven, CT), expresado utilizando el sistema de expresión de baculovirus pBlueBac (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), y fue confirmado por análisis de transferencia Western. La secuencia de nucleótidos a continuación codifica el polipéptido utilizado para generar los anticuerpos.

TCTGTAAAGGTTGGTGGAGAGGCAGGTCCATCTGTCACACTACCCTGCCACTACA
GTGGAGCTGTCACATCAATGTGCTGGAATAGAGGCTCATGTTCTCTATTACATG
CCAAAATGGCATTGTCTGGACCAATGGAACCCACGTCACCTATCGGAAGGACAC
ACGCTATAAGCTATTGGGGGACCTTTCAAGAAGGGATGTCTCTTTGACCATAGAA
AATACAGCTGTGTCTGACAGTGGCGTATAATTGTTGCCGTGTTGAGCACCGTGGGT
GGTTCAATGACATGAAAATCACCGTATCATTGGAGATTGTGCCACCCAAGGTCA
CGACTACTCCAATTGTCACAACCTGTTCCAACCGTCACGACTGTTCGAACGAGCAC
CACTGTTCCAACGACAACGACTGTTCCAACGACAACCTGTTCCAACAACAATGAG
CATTCCAACGACAACGACTGTTCCGACGACAATGACTGTTTCAACGACAACGAG
CGTTCCAACGACAACGAGCATTCCAACAACAACAAGTGTTCAGTGACAACAAC
GGTCTCTACCTTTGTTCTCCAATGCCTTTGCCAGGCAGAACCATGAACCAGTA
GCCACTTCACCATCTTCACCTCAGCCAGCAGAAACCCACCCTACGACACTGCAG
GGAGCAATAAGGAGAGAACCCACCAGCTCACCATTGTACTCTTACACAACAGAT
GGGAATGACACCGTGACAGAGTCTTCAGATGGCCTTTGGAATAACAATCAAACCT
CAAACCTGTTCTAGAACATAGTCTACTG (SEQ ID NO:53)

- 20 La secuencia de aminoácidos codificada por el mismo es como sigue:

SVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSMCWNRGSCSLFTCQNGIVWTNGTHVTYRKDT
RYKLLGDLRSDVSLTIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITVSLEIVPPKVTTTP
IVTTVPTVTTVRTSTTVPTTTTVPPTTTTMSIPTTTTVPPTMTVSTTTSPPTTTSIPTT
TSVPVTTTVSTFVPPMPLPRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSY
TTDGNDTVTESSDGLWNNNQTLFLEHSL (SEQ ID NO:54)

- 25 Para facilitar la purificación del TIM-1 recombinante, el constructo de expresión puede incorporar secuencias de codificación para el dominio de enlazamiento V5 y una etiqueta HIS. Se generaron anticuerpos monoclonales completamente humanos IgG2 e IgG4 (mAb), dirigidos contra TIM-1 a partir de cepas Xenomouse[®] que producen anticuerpos humanos manipuladas para ser deficientes en la producción de anticuerpos de ratón y para contener la mayoría del repertorio genético del anticuerpo humano en fragmentos de dimensiones a nivel de megabase a partir de los loci de cadena humana pesada y liviana kappa como se describió previamente en Yang et al., Cancer Res. (1999). Dos cepas Xenomouse[®], una cepa hlgG2 (xmg-2) y una cepa IgG4 (3C-1), fueron inmunizadas con el antígeno de TIM-1 (SEQ ID NO: 54). Ambas cepas respondieron bien a la inmunización (Tablas 2 y 3).

Tabla 2

Título en suero de cepa XENOMOUSE®hlgG ₂ inmunizada con antígeno de TIM-1.		
Grupo 1: 5 ratones (cepa hlgG ₂); modo de inmunización = almohadilla de la pata		
	Reactividad a TIM-1	
	Títulos a través de hlgG	
ID de ratón	Sangrado después de 4 inyecciones	Sangrado después de 6 inyecciones
M716-1	600,000	600,000
M716-2	600,000	500,000
M716-3	200,000	400,000
M716-4	300,000	200,000
M716-5	400,000	400,000
Control negativo	75	110
Control positivo	-	600,000

Tabla 3

Título en suero de cepa XENOMOUSE®IgG ₄ inmunizada con antígeno de TIM-1.		
Grupo 2: 5 ratones (cepa IgG ₄); modo de inmunización = almohadilla de la pata		
	Reactividad a TIM-1	
	Títulos a través de hlgG	
ID de ratón	Sangrado después de 4 inyecciones	Sangrado después de 6 inyecciones
M326-2	15,000	73,000
M326-3	7,500	60,000
M329-1	27,000	30,000
M329-3	6,500	50,000
M337-1	2,500	16,000
Control negativo	<100	90
Control positivo	-	600,000

5 Se generaron líneas celulares de hibridoma a partir de los ratones inmunizados. Los hibridomas seleccionados designados como 1.29, 1.37, 2.16, 2.17, 2.24, 2.45, 2.54, 2.56, 2.59, 2.61, 2.70, y 2.76 (y subclones de los mismos) fueron caracterizados posteriormente. Los anticuerpos producidos por las líneas celulares 1.29 y 1.37 poseen cadenas pesadas de IgG2 completamente humanas con cadenas liviana kappa humanas mientras que aquellos

anticuerpos producidos por las líneas celulares 2.16, 2.17, 2.24, 2.45, 2.54, 2.56, 2.59, 2.61, 2.70, y 2.76 poseen cadenas pesadas de IgG4 completamente humanas con cadenas livianas kappa humanas.

5 Las secuencias de aminoácidos de las regiones de dominio variable de cadena pesada de los doce anticuerpos anti-TIM-1 con sus respectivas secuencias de línea germinal se muestran en la Tabla 4 a continuación. Las secuencias de aminoácidos de las regiones de dominio variable de cadena liviana correspondientes se muestran en la Tabla 5 a continuación. "X" indica cualquier aminoácido, preferiblemente la secuencia de línea germinal en la correspondiente posición del aminoácido. Las CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3) y las FRs (FR1, FR2 y FR3) en las inmunoglobulinas se muestran bajo los respectivos encabezamientos de columna.

Tabla 4. Análisis de cadena pesada

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	55	Línea germinal	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSN KYYADSVK G	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCAR	XXDY	WGQGLTLTVSSA
2.54	26	VH3-33/--/JH4b	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFTNYGLH	WVRQAPGKG LDWVA	VIWYDGSN KFYADSVK G	RFTISRDN SKNTLFLQ MN SLRAEDTA VYYCTR	DLDY	WGQGLTLTVSSA
	56	Línea germinal	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTPSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSN KYYADSVK G	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCAX	XXYDSSXXXY GMDV	WGQGTTLTVSSA
2.76	46	VH3-33/D3-22/JH6b	XXXXEQSGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMY	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSN KYYADSVK G	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCAR	DFYDSSRYHY GMDV	WGQGTTLTVSSA
	57	Línea germinal	QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVS	GGSSSSGGYY WS	WIRQHPGKG LEWIG	YIYSGSTY YNPSL KS	RVTISVDT SKNQPSL KLS SVTAADTA VYYCAR	XXXXSSSWYX XFDY	WGQGLTLTVSSA
2.59	34	VH4-31/D6-13/JH4b	XXXXXQSGPRLVKP SQTLSLTCTVS	GGSSSDGYY WS	WIRQHPGKG LEWIG	YIYSGSTF YNPSLKS	RVAISVDT SKNQFSLK LS SVTAADTA VYYCAR	ESPHSSNWYS GFDC	WGQGLTLTVSSA

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	58	Línea germinal	QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSN KYYADSVK G	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCAR	DYYDSSXXXXX FDY	WGQGTLTVSSA
2.70	42		QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFIFSRYGMH	WVRQAPGKG LKWVA	VIWYDGSN KLYADSVK G	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCAR	DYYDNRHHW GFDY	WGQGTLTVSSA
2.24	18		QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSRYGMH	WVRQAPGKG LKWVA	VIWYDGSN KLYADSVK G	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCAR	DYYDNRHHW GFDY	WGQGTLTVSSA
2.61	38	VH3-33/D3-22/JH4b	QVQLVEAGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFRSYGMH	WVRQAPGKG LKWVA	VIWYDGSN KYYTDS VKG	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCVR	DYYDNRHHW GFDY	WGQGTLTVSSA
2.56	30		QVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKG LEWVA	VIWYDGSR KYYADSVK G	RFTISRDN SKNTLYLQ MN SLRAEDTA VYYCAR	DYYDTSRHHW GFDC	WGQGTLTVSSA
	59	Línea germinal	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKG LEWVG	RIKSKTDG GTTDYAAP VK G	RFPTISRDN DSKNTLYL QMN SLKTEDTA VYYCTX	XDXXXDY	WGQGTLTVSSA

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
2.16	10	VH3-15/D3-16/JH4b	XXXXEQSGGGVVKP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMT	WVRQAPGKG LEWVG	RIKRRTDG GTTDYAAP VK G	RFTISRDD SKNTLYLQ MN NLKNEDTA VYYCTS	VDNDVDY	WGQGLTLTVSSA
	60	Línea germinal	QIVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVS	GGSVSSGGYY WS	WIRQPPGKG LEWIG	YIYSGSTN YNPSLKS	RVTISVDT SKNQFSLK LSLKLS SVTAADTA VYYCAR	XXXWXXXFDY	WGQGLTLTVSSA
1.29	2	VH4-61/D1-7/JH4b	QVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVS	GGSVSSGGYY WS	WIRQPPGKG LEWIG	FIYTGSTN YNPSLKS	RVSISVDT SKNQFSLK LS SVTAADAA VYYCAR	DYDWSFHFYD	WGQGLTLTVSSA
	61	Línea germinal	EVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMS	WVRQAPGKG LEWVG	RIKSKTDG GTTDYAAP VK G	RFTISRDD SKNTLYLQ MN SLKTEDTA VYYCTT	XXXSGDY	WGQGLTLTVSSA
2.45	22	VH3-15/D6-19/JH4b	XXXXXQSGGGVVKP GGSLRLSCAAS	GFTFSNAWMT	WVRQAPGKG LEWVG	RIKRRTDG GTTDYAAP VK G	RFTISRDD SENTLYLQ HN SLETEDTA VYYCTT	VDNSGDY	WGQGLTLTVSSA
	62	Línea germinal	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFSYWMS	WVRQAPGKG LEWVA	NIKQDGE KYYVDSVK G	RFTISRDN AKNSLYLQ M N SLRAEDTA VYYCAR	XDY	WGQGLTLTVSSA

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
1.37	6	VH3-7/--/JH4b	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFTNYWMS	WVRQAPGKG LEWVA	NIQQDGE KYYVDSVR G	RFTISRDN AKNSLYLQ M N SLRAEDSA VYYCAR	WDY	WGQGLTVTVSSA
	63	Línea germinal	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKG LEWVS	YISSSSTI YYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQ M N SLRDEDTA VYYCAX	XFDY	WGQGLTVTVSSA
2.17	14	VH3-48/--/JH4b	QVQLLEQSGGGLVQP GGSLRLSCAAS	GFTFSTYSMN	WVRQAPGKG LEWVS	YIRSTSTIY YAESLKG	RFTISSDN AKNSLYLQ M N SLRDEDTA VYYCAR	DFDY	WGQGLTVTVSSA

Tabla 5. Análisis de cadena liviana

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	64	Línea germinal	EIVLTQSPGTLSS PGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAP R LLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSG GTDFTLTISRL EPEDFAVYYC	QQYGSSXXLT	FGGGTKVEIKR
2.54	28	A27/JK4	ETQLTQSPGTLSS PGERVTLSC	RASQSVSNYYLA	WYQQKPGQAP R LLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSG GTDFTLTISRL EPEDCAECYC	QQYGSSLPLT	FGGGTKVEIKR
	65	Línea germinal	DIVMTQSPVLSPLPVT PGEPAISIC	RSSQSLHNSNGYN YLD	WYVQKPGQSP Q LLIY	LGSNRAS	GVPDRFSGSG SGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC	MQALQTXXT	FGGGTKVEIKR
2.16	12	A3/JK4	XXXTQSPVLSPLPVT PGEPAISIC	RSSQSLHNSNGYN YLD	WYVQKPGQSP Q LLIY	LGSNRAS	GVPDRFSGSG SGTDFTLKISR V EAEDIGLYYC	MQALQTPLT	FGGGTKVDIKR
2.45	24		XXXXTQSPVLSPLPVT PGEPAISIC	RSSQSLHNSNGYN YLD	WYVQKPGQSF Q LLIY	LGSNRAS	GVPDRFSGSG GTDFTLKISR V EAEDVGVYYC	MQALQTPLT	FGGGTKVEIKR

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	66	Línea germinal	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTC	RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAP K RLIY	AASSLQS	GVPDRFSGSG SGTEFTLTISL QPEDFATYYC	LQHNSYPLT	FGGGTKVEIKR
1.29	4	A30/JK4	DIQMTQSPSSLSAS IGDRVITTC	RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAP K RLIY	AASSLQS	GVPDRFSGSG SGTEFTLTISL QPEDFATYYC	LQHNSYPLT	FGGGTKVEIKR
	67	Línea germinal	DIVMTQTPPLSSPVT LGQPASISC	RSSQSLVHSDGNT YLS	WLQQRPGQPP R LLIY	KISNRFS	GVPDRFSGSG AGTDFTLK ISR EAEDVGVYYC	MQATQFPXIT	FGQBTRLEIKR
2.17	16	A23/JKS	EIQLTQSPPLSSPVT LGQPASISC	RSSQSLVHSDGDT YLN	WLQQRPGQPP R LLIY	KISTRFS	GVPDRFSGSG AGTDFTLK ISR ETDDVGIYYC	MQTTQIPQIT	FGGGTRLEIKR
	68	Línea germinal	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAP K LLIY	AASSLQS	GVPDRFSGSG SGTDFTLTISL QPEDFATYYC	QQSYSTPPT	FGGGTKVEIKR

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
2.24	20	012/JK1	DIQLTQSPSSLAS VGDRVITIC	RASQSIYSYLN	WYQQKPGKAP K LLIY	AASSLQS	GVPDRFSGSG SGTDFLTITSSL QPEDFATYYC	QQSYSTPPTT	FGQGTKVEIKR
	69	Línea germinal	DIVMTQTPLSSPT LGQPASISC	RSSQSLVHSDGNT YLS	WLQQRPGQPP R LLIY	KISNRFS	GVPDRFSGSG AGTDFTLK ISRV EAEDVGIVYYC	MQATQFPQT	FGQGTKVEIKR
1.37	8	A23/JK1	DIVMTQTPLSSTVI LGQPASISC	RSSQSLVHSDGNT YLN	WLQQRPGQPP R LLIY	MISNRFS	GVPDRFSGSG AGTDFTLK ISRV EAEDVGIVYYC	MQATESPQT	FGQGTKVEIKR
	70	Línea germinal	DIVMTQTPLSLPVT PGEPASISC	RSSQSLVHSDGNT TYLD	WYLQKPGQSP Q LLIY	TLSYRAS	GVPDRFSGSG SGTDFTLKISR V EAEDVGIVYYC	MQRIEFPIT	FGQGTKVEIKR

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
2.70	44		DIVMTQTPLSLPVT PGEPA SISC	RSSRSLDSDDDGN TYLD	WYLQKPGQSP Q LLIY	TLSYRAS	GVPDRFSGSG SGTDFTLKISR V EAEDVGVVYC	MQRVEFPIT	FGQGTRLEIKR
2.56	32	OI/JKS	EIVMTQTPLSLPVT PGEPA SISC	RSSQSLDSEDGN TYLD	WYLQKPGQSP Q LLIY	TLSHRAS	GVPDRFSGSG SGTDFTLKISR V EAEDVGVVYC	MQRVEFPIT	FGQGTRLEIKR
2.76	48		XXXXTQCPLSLPVT PGEPA SISC	RSSQSLDSDDDGN TYLD	WYLQKPGQSP Q LLIY	TVSYRAS	GVPDRFSGSG SGTDFTLKISR V EAEDVGVVYC	MQRVEFPIT	FGQGTRLEIKR
	71	Línea germinal	EIVLTQSPDFQSVT PKEKVTTTC	RASQSIGSSLH	WYQQKPDQSP K LLIK	YASQSFS	GVPDRFSGSG SGTDFTLTINSL EAEDAATYY C	HQSSSLPFT	FGPGTKVDIKR
2.59	36	A26/JK3	XXXXTQSPDFQSV T PKEKVTTTC	RASQSIGSRLH	WYQQKPDQSP K LLIK	YASQSFS	GVPDRFSGSG SGTDFTLTINSL EAEDAATYY C	HQSSSLPFT	FGPGTKVDIKR

mAb	SEQ ID NO:	D	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	72	Línea germinal	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTC	RASQGIRNDLG	WYQQKPGKAP K RLIY	AASSLQS	GVPSRPSGSG SGTEFTLTISLL QPEDFATYYC	LQHNSYPXX	FGQGTKLEIKR
2.61	40	A30/JK2	DIQMTQSPSSRCA S VGDRVITTC	RASQGIRNDLA	WYQQKPGKAP K RLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSR SGTEFTLTISLL QPEDFAAYYC	LQHNSYPPS	FGQGTKLEIKR

5 El VH3-33 de cadena pesada de anticuerpo humano fue seleccionado frecuentemente en el reordenamiento productivo para producir exitosamente enlazamiento del anticuerpo a TIM-1. Cualquier variante de una línea germinal de anticuerpo VH3-33 humano en la confección de un reordenamiento productivo de anticuerpo a TIM-1 está dentro del alcance de la invención. Otras regiones de cadena pesada V seleccionadas en los anticuerpos de enlazamiento a TIM-1 incluyeron: VH4-31, VH3-15, VH4-61, VH3-7 y VH3-48. Las regiones de cadena liviana V seleccionadas incluyen: A27, A3, A30, A23, O12, O1, y A26. Se entiende que puede utilizarse la λ k Xenomouse® para generar anticuerpos anti-TIM-1 utilizando regiones lambda V.

10 El uso de la línea germinal de dominio variable de cadena pesada de los doce anticuerpos anti-TIM-1 se muestra en la Tabla 6. El uso de la línea germinal de dominio variable de cadena liviana se muestra en la Tabla 7 (a continuación).

Tabla 6. Uso de línea germinal de regiones de dominio variable de cadena pesada

mAb	Pesada V	Secuencia V	#N ^o s	N	D1	Secuencia D1	#N ^o s	N	D2	Secuencia D2	#N ^o s	N	JH	Secuencia J	Región Constante	CDR1	CDR2	CDR3
2.16	VH3-15 (1-285)	TGTACC	5	TCA GT	D3-16 (291-296)	CGATAA	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	7	TGACGTG	JH4b (304-343)	GACTAC	G4 (344-529)	64-93	136-192	289-309
2.70	VH3-33 (1-290)	GAGAGA	0		D3-22 (291-306)	TTACTATGAT AATAGT (SEQ ID NO: 73)	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	15	AGACATCA CTGGGGG (SEQ ID NO: 74)	JH4b (322-364)	TTTGAC	G4 (365-502)	70-99	142-192	289-330
2.59	VH4-31 (2-284)	GAGAGA	8	ATC CCC TC	D6-13 (293-309)	ATAGCAGCAA CTGGTAC (SEQ ID NO: 75)	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	5	TGGGG	JH4b (315-358)	CTTTGA	G4 (359-545)	61-96	139-186	283-324
2.24	VH3-33 (1-296)	GAGAGA	0		D3-22 (297-312)	TTACTATGAT AATAGT (SEQ ID NO: 76)	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	15	AGACATCA CTGGGGG (SEQ ID NO: 77)	JH4b (328-370)	TTTGAC	G4 (371-568)	76-105	148-198	295-336
1.29	VH4-61 (1-293)	GAGAGA	5	TTA TG	D1-7 (299-304)	ACTGGA	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	6	GCTTCC	JH4b (311-355)	ACTTTG	G2 (356-491)	70-105	148-195	292-321
2.61	VH3-33 (1-296)	GAGAGA	0		D3-22 (297-312)	TTACTATGAT AATAGT (SEQ ID NO: 78)	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	15	AGACATCA CTGGGGG (SEQ ID NO: 79)	JH4b (328-370)	TTTGAC	G4 (371-534)	76-105	148-198	295-336
2.76	VH3-33 (1-281)	TGCGAG	6	GGA TTT	D3-22 (288-300)	CTATGATAGT AGT (SEQ ID NO: 80)	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	7	CGTTACC	JH6b (308-358)	ACTACG	G4 (359-544)	64-93	136-186	283-324
2.54	VH3-33 (1-296)	GCGAGA	-	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	2	TC	JH4b (299-340)	TTGACT	G4 (341-537)	76-105	148-198	295-306
1.37	VH3-7 (7-300)	GCGAGA	-	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	3	TGG	JH4b (304-343)	GACTAC	G2 (344-469)	82-111	154-204	301-309
2.17	VH3-48 (2-291)	TGTGCG	-	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	5	CGGGA	JH4b (297-340)	CTTTGA	G4 (341-538)	76-105	148-198	295-306
2.45	VH3-15 (2-286)	CCACAG	7	TCG ATA A	D6-19 (294-299)	CAGTGG	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	0		JH4b (300-340)	TGACTA	G4 (341-526)	61-90	133-189	286-306
2.56	VH3-33 (1-290)	GAGAGA	0		D3-22 (291-301)	TTACTATGAT A (SEQ ID NO: 81)	-N.A.	-N.A.	-N.A.	-N.A.	20	CGAGTCGG CATCACTG GGGG (SEQ ID NO: 82)	JH4b (322-364)	TTTGAC	G4 (365-527)	70-99	142-192	289-330

Tabla 7. Uso de línea germinal de regiones de dominio variable de cadena liviana

mAb	VL	Secuencia V	Nos	N	JL	Secuencia J	Región constante	CDR1	CDR2	CDR3
2.70	O1 (46-348)	TTTCCT	0		JK5 (349-385)	ATCACC	IGKC (386-522)	115-165	211-231	328-354
2.59	A26 (1-272)	TTTACC	0		JK3 (273-310)	ATTACAC	IGKC (311-450)	58-90	136-156	253-279
2.24	O12 (1-287)	CCCTCC	0		JK1 (288-322)	GACGTT	IGKC (323-472)	70-102	148-168	265-291
1.29	A30 (46-331)	ACCCTC	0		JK4 (332-367)	TCACTT	IGKC (368-504)	115-147	193-213	310-336
2.56	O1 (46-348)	TTTCCT	0		JK5 (349-385)	ATCACC	IGKC (386-521)	115-165	211-231	328-354
2.61	A30 (1-287)	CCCTCC	3	CAG	JK2 (291-322)	TTTTGG	IGKC (323-470)	70-102	148-168	265-291
2.76	O1(1-290)0	GTTTCC	0		JK5 (291-328)	GATCAC	IGKC (329-419)	58-108	154-174	271-297
1.37	A23 (43-344)	TCCTCA	0		JK1 (345-379)	GACGTT	IGKC (380-454)	112-159	205-225	322-348
2.17	A23 (1-302)	TCCTCA	1	A	JK5 (304-340)	ATCACC	IGKC (341-490)	70-117	163-183	280-309
2.54	A27 (1-286)	GCTCAC	4	TCCC	JK4 (291-328)	GCTCAC	IGKC (329-480)	70-105	151-171	268-297
2.16	A3 (2-290)	AACTCC	2	GC	JK4 (293-328)	TCACTT	IGKC (329-447)	61-108	154-174	271-297
2.45	A3 (1-287)	AACTCC	2	GC	JK4 (290-325)	TCACTT	IGKC (326-465)	58-105	151-171	268-294

5 Las secuencias que codifican anticuerpos monoclonales 1.29, 1.37, 2.16, 2.17, 2.24, 2.45, 2.54 2.56, 2.59, 2.61, 2.70, y 2.76, respectivamente, que incluyen la secuencia (A) de nucleótido de cadena pesada, la secuencia (B) de aminoácidos de cadena pesada y la secuencia (C) de nucleótidos de cadena liviana con la secuencia (D) de aminoácidos codificados son provistas en el listado de secuencias como se resume en la Tabla más arriba. Un anticuerpo monoclonal particular, 2.70, fue subclonado adicionalmente y está designado como 2.70.2, véase Tabla 1.

Ejemplo 2

Reactividad a anticuerpo con proteína TIM-1 enlazada por membrana por FACS.

10 Se llevó a cabo el análisis de Selección Celular Activada Fluorescente (FACS) para demostrar la especificidad de los anticuerpos anti-TIM-1 para el antígeno de TIM-1 enlazado a la membrana y para identificar anticuerpos preferidos para uso como un agente terapéutico o de diagnóstico. El análisis fue llevado a cabo sobre dos líneas celulares de cáncer renal, ACHN (ATCC#:CRL-1611) y CAKI-2 (ATCC#:HTB-47). Una línea celular de cáncer de mama que no expresa el antígeno de TIM-1, BT549, fue utilizada como control. La Tabla 8 muestra que ambos anticuerpos 2.59.2 y 2.70.2 se enlazan específicamente al antígeno de TIM-1 expresado sobre células ACHN y CAKI-2, pero no en células BT549 negativas al antígeno. Con base en las Relaciones Medias Geométricas normalizadas al control de isotipos de anticuerpo irrelevante (pK16), las células ACHN tienen una expresión en superficie celular más alta de la proteína de TIM-1 que las células CAKI-2.

Tabla 8

Anticuerpo	BIN	Relación Media Geométrica (con respecto al control negativo)		
		ACHN	CAKI-2	BT549
2.59.2	1	15.2	7.7	1.4
2.70.2	6	19.4	8.8	1.8
1.29	1	17.9		1.2
2.16.1	2	7.9		1.5
2.56.2	5	12.2		1.5
2.45.1	8	4.3		1.1

20

Ejemplo 3

Especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1

25 Los anticuerpos anti-TIM-1 se enlazaron específicamente a la proteína de TIM-1 pero no a una proteína irrelevante en un ensayo ELISA. Los resultados de enlazamiento específico del antígeno de TIM-1 (con una etiqueta V5-HIS) para cuatro de los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 (1.29, 2.56.2, 2.59.2 y 2.45.1) así como un control coincidente con isotipo mAb PK16.3 se muestran en la figura 1. El eje X representa los anticuerpos usados en el orden listado más arriba y el eje Y es la densidad óptica. El enlazamiento respectivo de estos anticuerpos a la proteína irrelevante (también con una etiqueta V5-HIS), se muestra en la figura 2.

Protocolo de ELISA

30 Una placa de ELISA de alto enlazamiento de proteína de 96 pozos (Coming Costar cat. no. 3590) fue recubierta con 50 µL del antígeno de TIM-1 a una concentración de 5 µg/mL diluido en buffer de recubrimiento (Carbonato 0.1 M, pH 9.5), y se incubó durante la noche a 4°C. Los pozos fueron lavados entonces cinco veces con 200-300 µL, de Tween-20 al 0.5% en PBS. A continuación, las placas fueron bloqueadas con 200 µL de diluyente de ensayo (Pharmingen, San Diego, CA, cat. no. 26411E) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 fueron diluidos entonces en diluyente de ensayo con concentraciones finales de 7, 15,

35

31.3, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 ng/mL. Se utilizó un anticuerpo anti-V5-HRP a 1:1000 para detectar el péptido que contenía V5 como control positivo para ELISA. Las placas fueron lavadas entonces de nuevo como se describe más arriba. A continuación se agregaron 50 μ L de cada dilución de anticuerpo a los pozos apropiados, luego se incubaron durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas de nuevo como se describe más arriba, y luego se agregaron 50 μ L del anticuerpo secundario (HRP antihumano de cabra) a 1:1000 y se dejó incubarlo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas de nuevo como se describe más arriba y luego se desarrollaron con 100 μ L de solución de sustrato TMB/pozo (relación 1:1 de solución A+B) (Pharmingen, San Diego, CA, cat. no. 2642KK). Finalmente, la reacción fue detenida con 50 μ L de ácido sulfúrico y las placas leídas a 450 nm con una corrección de 550 nm.

10 Ejemplo 4

Secuencia de anticuerpos

Con el fin de analizar estructuras de anticuerpos, tal como se describen aquí, se clonaron genes que codifican los fragmentos de cadena pesada y liviana del hibridoma particular. La clonación y secuenciación de genes fueron logradas como sigue. Se aislaron Poli(A)+ ARNm a partir de aproximadamente 2×10^5 células de hibridoma derivadas de ratones Xenomouse[®] inmunizados utilizando un kit Fast-Track (Invitrogen). La generación de ADNc cebado aleatorio fue seguida por PCR. Se utilizaron cebadores de dominio variable específicos de la familia V_k humanos o humanos VH (Marks et al., 1991) o un cebador humano VH universal, MG-30 (CAGGTGCAGCTGGAGGAGTCIGG) (SEQ ID NO: 83) en conjunción con cebadores específicos para el humano:

Región constante Cy2 (MG-40d; 5'-GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA-3' (SEQ ID NO: 84));

20 Región constante Cy1 (HG1; 5' CAC ACC GCG GTC ACA TGG C (SEQ ID NO: 85)); o

Región constante Cy3 (HG3; 5' CTA CTC TAG GGC ACC TGT CC (SEQ ID NO: 86)) o el dominio constante C_k humano (h_kP2 ; como se describió previamente en Green et al., 1994). Las secuencias de transcritos de cadenas pesada derivada de MAbs y kappa humanas de hibridomas fueron obtenidos por secuenciación directa de los productos de PCR generados a partir de poli (A⁺) ARN utilizando los cebadores descritos más arriba. Los productos de PCR también fueron clonados en pCRII utilizando un kit de clonación TA (Invitrogen) y ambas cadenas fueron secuenciadas utilizando los kits de secuenciación de terminador colorante Prism y una máquina de secuenciación ABI 377. Todas las secuencias fueron analizadas por alineamientos al "directorio de secuencia V BASE" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido) utilizando los programas de software MacVector y Geneworks.

30 En cada una de las Tablas 4-7 anteriores, los dominios de CDR fueron determinados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Veas Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)).

Ejemplo 5

Discretización de epítomos y determinación de la afinidad BiaCore[®]

35 Discretización de epítomos

Ciertos anticuerpos, descritos aquí fueron "discretizados" de acuerdo con el protocolo descrito en la Publicación de Solicitud Patente de los Estados Unidos No. 20030157730, publicada el 21 de agosto de 2003, titulada "Antibody Categorization Based on Binding "Características".

40 Se prepararon perlas conjugadas de MxhlgG para acoplamiento a anticuerpo primario. El volumen del sobrenadante necesario fue calculado utilizando la siguiente fórmula: $(n+10) \times 50 \mu\text{L}$ (en donde n = número total de muestras sobre la placa). Cuando la concentración era conocida, se usó 0.5 $\mu\text{g/mL}$. La reserva de perla fue sometida a vórtice suavemente, luego se diluyó en sobrenadante hasta una concentración de 2500 de cada perla por pozo o 0.5×10^5 /mL y se incubó en un agitador en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche, o 2 horas si estaba a una concentración conocida de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Después de la aspiración, se agregaron 50 μL de cada perla a cada pozo de una placa de filtros, luego se lavó agregando 100 μL /pozo de regulador de lavado y se aspiró. El antígeno y los controles fueron agregados a la placa de filtros a 50 μL /pozo y luego se recubrió y se dejó incubarlo en la oscuridad durante 1 hora con agitación. Después de una etapa de lavado, se agregó un anticuerpo secundario desconocido a 50 μL /pozo utilizando la misma dilución (o concentración si era conocida) que se usó para el anticuerpo primario. Las placas fueron incubadas entonces en la oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación seguida por una etapa de lavado. A continuación, se agregaron 50 μL /pozo de mxhlgG biotinilado diluido 1:500 y se dejó incubarlo en la oscuridad durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado, se agregaron 50 μL /pozo de estreptavidina-PE a 1:1000 y se dejó en incubación en la oscuridad durante 15 minutos

con agitación a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado, cada pozo fue resuspendido en 80 μ L de regulador de bloqueo y se leyó utilizando el sistema Luminex.

La Tabla 9 muestra los anticuerpos monoclonales generados pertenecientes a ocho discretizaciones distintas. Los anticuerpos se enlazaron a al menos tres epítomos distintos sobre el antígeno de TIM-1.

5 Determinación de la afinidad de mAb a anti-TIM-1 utilizando el análisis BiaCore[®]

10 El análisis BiaCore[®] fue utilizado para determinar la afinidad de enlazamiento del anticuerpo anti-TIM-1 al antígeno de TIM-1. El análisis fue llevado a cabo a 25°C utilizando un biosensor BiaCore[®] 2000 equipado con un chip sensor CM5 de grado investigación. Se preparó una superficie de anticuerpo de cabra antihumano de alta densidad sobre un chip CM5 BiaCore[®] utilizando acoplamiento de aminos rutinario. Los sobrenadantes de anticuerpo fueron diluidos a ~5 μ g/mL en un regulador de desarrollo HBS-P que contiene 100 μ g/mL de BSA y 10 mg/mL de carboximetildextrano. Los anticuerpos fueron capturados entonces individualmente sobre una superficie separada utilizando un tiempo de contacto de 2 minutos, y un lavado de 5 minutos para estabilización de la línea base del anticuerpo.

15 El antígeno TIM-1 fue inyectado a 292 nM sobre cada superficie durante 75 segundos, seguido por una disociación de 3 minutos. Los datos de enlazamiento doblemente referenciados fueron obtenidos sustrayendo la señal de una celda de flujo de control y sustrayendo el desplazamiento de la línea base sobre una inyección de regulador justo antes de la inyección de TIM-1. Los datos de enlazamiento de TIM-1 para cada mAb fueron normalizados para la cantidad de mAb capturados sobre cada superficie. Las respuestas normalizadas, corregidas en cuanto al desplazamiento también fueron medidas. Los resultados del análisis cinético del enlazamiento de mAb a anti-TIM-1 a 25°C se presentan en la lista de la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Discretización de competición y KDs para mAbs específico de TIM-1		
Discretización	Anticuerpo	Afinidad en nM por BIAcore
1	2.59	0.38
	1.29	3.64
2	2.16	0.79
3	2.17	2.42
4	1.37	2.78
	2.76	0.57
	2.61	1.0
5	2.24	2.42
	2.56	1.1
6	2.70	2.71
7	2.54	3.35
8	2.45	1.15

Ejemplo 6

Mapeo de epítomos

5 Se probó el mAb 2.70.2 anti-TIM-1 para reactividad contra péptidos solapados diseñados a partir de la secuencia del antígeno TIM-1. Las placas de ensayo fueron recubiertas con los péptidos del fragmento TIM-1, utilizando péptidos irrelevantes o sin péptidos como controles. Se agregó mAb 2.70.2 anti-TIM-1 a las placas, se incubó, se lavó y luego los anticuerpos enlazados fueron detectados utilizando conjugado Ig HRP anti-humano. El anticuerpo humano no específico a TIM-1, un anticuerpo de control de isotipo o ningún anticuerpo sirvieron como controles. Los resultados mostraron que mAb 2.70.2 reaccionó específicamente con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos PMPLPRQNHEPVAT (SEQ ID NO: 87), correspondiente a los aminoácidos 189-202 del inmunógeno TIM-1 (SEQ ID NO: 54).

La especificidad de mAb 2.70.2 fue definida adicionalmente ensayando contra los siguientes péptidos:

10 A) PMPLPRQNHEPVAT (SEQ ID NO: 87)

B) PMPLPRQNHEPV (SEQ ID NO: 88)

C) PMPLPRQNHE (SEQ ID NO: 89)

D) PMPLPRQN (SEQ ID NO: 90)

E) PMPLPR (SEQ ID NO: 91)

15 F) PLPRQNHEPVAT (SEQ ID NO: 92)

G) PRQNHEPVAT (SEQ ID NO: 93)

H) QNHEPVAT (SEQ ID NO: 94)

I) HEPVAT (SEQ ID NO: 95)

20 Los resultados mostraron que mAb 2.70.2 se enlazó específicamente a los péptidos A, B, C y F, estrechando el epítipo del anticuerpo a PLPRNHE (SEQ ID NO: 96).

25 Como se muestra en la Tabla 10, se hicieron péptidos sintéticos en los cuales cada residuo de aminoácido del epítipo fue reemplazado con una alanina y se probó en cuanto a la reactividad con mAb 2.70.2. En este experimento, la tercera prolina y los residuos asparagina fueron determinados como críticos para el enlazamiento de mAb 2.70.2. Adicionalmente, ensayos de péptidos con residuos terminales N o C adicionales eliminados mostraron que el enlazamiento de mAb 2.70.2 era retenido por el epítipo mínimo LPRQNH (SEQ ID NO: 97).

Tabla 10

										SEQ ID NO:	Reactividad de mAb 2.70.2
P	M	P	L	P	R	Q	N	H	E	89	+
P	M	P	A	P	R	Q	N	H	E	98	+
P	M	P	L	A	R	Q	N	H	E	99	-
P	M	P	L	P	A	Q	N	H	E	100	+
P	M	P	L	P	R	A	N	H	E	101	+
P	M	P	L	P	R	Q	A	H	E	102	-
P	M	P	L	P	R	Q	N	A	E	103	+
		P	L	P	R	Q	N	H	E	104	+
			L	P	R	Q	N	H	E	105	+

										SEQ ID NO:	Reactividad de mAb 2.70.2
		P	L	P	R	Q	N	H	E	106	+
			L	P	R	Q	N	H	E	107	+

Ejemplo 7

Análisis inmunohistoquímico (IHC) de la expresión de TIM-1 en tejidos normales y tumorales

5 El análisis inmunohistoquímico (IHC) de la expresión de TIM-1 en especímenes de tejido normales y tumorales fueron llevados a cabo con técnicas conocidas en el arte. Se analizaron los anticuerpos 2.59.2, 2.16.1 y 2.45.1 anti-TIM-1 completamente humanos biotinilados. Se utilizó estreptavidina-HRP para la detección.

10 En resumen, los tejidos fueron desparafinizados utilizando técnicas convencionales, y luego procesados utilizando un proceso de recuperación de epítomos inducido por calor para revelar los epítomos antigénicos dentro de la muestra de tejido. Se incubaron secciones con 10% de suero de cabra normal durante 10 minutos. La solución de suero de cabra normal fue drenada y limpiada para eliminar el exceso de solución. Se incubaron las secciones con el mAb biotinilado anti-TIM-1 a 5 µg/mL durante 30 minutos a 25°C, y se lavó exhaustivamente con PBS. Después de incubación con el conjugado estreptavidina-HRP durante 10 minutos, se aplicó una solución de diaminobencidina (DAB) sobre las secciones para visualizar la inmunorreactividad. Para el control del isotipo, las secciones fueron incubadas con un control de mAb de comparación negativa con isotipo biotinilado a 5 µg/mL durante 30 minutos a 15 25°C en vez del mAb anti-TIM-1 biotinilado. Los resultados de los estudios de IHC se resumen en las Tablas 11 y 12.

20 Los especímenes fueron graduados sobre una escala de 0-3, con un marcador de 1+ indicando que la tinción está por encima de la observada en tejidos de control teñidos con un anticuerpo irrelevante para control de isotipo. Los especímenes histológicos correspondientes de un tumor renal y un tumor pancreático se muestran en la figura 3 (A y B). Además de estos tumores renales y pancreáticos, se tiñeron especímenes de cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer gástrico, melanoma, linfoma, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer esofágico y cáncer de cerebro así como los tejidos normales correspondientes, con mAb 2.59.2 anti-TIM-1. En general, las muestras de tejido de cáncer renal y las muestras de 25 tejido de cáncer pancreático fueron altamente positivas cuando se tiñeron con mAb 2.59.2 anti-TIM-1. No se observó tinción en tejidos normales. Estos resultados indican que el TIM-1 es un marcador de cáncer en estos tejidos y que puede utilizarse el mAb anti-TIM-1 para diferenciar cánceres de tejidos normales y para apuntar a células que expresan TIM-1 *in vivo*.

Tabla 11

Inmunohistología de expresión en tumores renales de proteína de TIM-1 detectada por mAb 2.59.2 anti-TIM-1			
Espécimen	Tipo celular	Histología	Marcador
1	Células malignas	No conocida	0
1	Otras	Sin células asociadas	2
2	Células malignas	Célula limpia	2
3	Células malignas	Célula limpia	0
4	Células malignas	Célula limpia	3
5	Células malignas	Célula limpia	2 (ocasional)
6	Células malignas	No conocida	2
7	Células malignas	Célula limpia	2

ES 2 557 769 T3

Inmunohistología de expresión en tumores renales de proteína de TIM-1 detectada por mAb 2.59.2 anti-TIM-1			
Espécimen	Tipo celular	Histología	Marcador
8	Células malignas	Célula limpia	0
9	Células malignas	Célula limpia	2 (ocasional)
10	Células malignas	Célula limpia	1-2
11	Células malignas	No conocida	3 (muchas)
12	Células malignas	Célula limpia	1-2
12	Otras	Sin células asociadas	2
13	Células malignas	Célula limpia	2 (ocasional)
14	Células malignas	Célula limpia	1-2
15	Células malignas	Célula limpia	3-4
16	Células malignas	No conocida	1-2
17	Células malignas	No conocida	4 (ocasional)
18	Células malignas	No conocida	1-2
19	Células malignas	Célula limpia	0
20	Células malignas	Célula limpia	3-4
21	Células malignas	Célula limpia	2 (ocasional)
22	Células malignas	Célula limpia	3
23	Células malignas	Célula limpia	2
24	Células malignas	No conocida	3-4 (ocasional)
25	Células malignas	No conocida	2-3
26	Células malignas	No conocida	3
27	Células malignas	Célula limpia	2
27	Otras	Sin células asociadas	2
28	Células malignas	No conocida	2
29	Células malignas	Célula limpia	2-3
30	Células malignas	Célula limpia	2
31	Células malignas	Célula limpia	2-3
32	Células malignas	Célula limpia	0

Inmunohistología de expresión en tumores renales de proteína de TIM-1 detectada por mAb 2.59.2 anti-TIM-1			
Espécimen	Tipo celular	Histología	Marcador
33	Células malignas	Célula limpia	0
34	Células malignas	Célula limpia	2
34	Otros	Sin células asociadas	2
35	Células malignas	Célula limpia	2-3
36	Células malignas	Célula limpia	3
37	Células malignas	No conocida	3
38	Células malignas	Célula limpia	3
39	Células malignas	No conocida	2
40	Células malignas	Célula limpia	2-3

Tabla 12

Inmunohistología de tejido humano normal con mAb 2.59.2 anti-TIM-1		
Tejido	Marcador	
	Espécimen 1	Espécimen 2
Córtex adrenal	0	0
Médula adrenal	0	1
Vejiga: Músculo liso	0	0
Vejiga: Epitelio transicional	3	0
Córtex cerebral: Bliá	0	0
Córtex cerebral: Neuronas	0	0
Mama: Epitelio	0	0
Mama: Estroma	0	0
Colon: Epitelio	0	0
Colon: Ganglios	0	NA
Colon: Compartimiento inflamatorio	3-4 (ocasional)	3 (ocasional)
Colon: Músculo liso	1 (ocasional)	0
Corazón: Miocitos cardíacos	0	0
Córtex renal: Glomérulos	2-3	2

ES 2 557 769 T3

Inmunohistología de tejido humano normal con mAb 2.59.2 anti-TIM-1		
Tejido	Marcador	
	Espécimen 1	Espécimen 2
Córtex renal: Epitelio tubular	2	2-3
Médula renal: Epitelio tubular	2	0
Médula renal: Otros	NA	2-3
Hígado: Epitelio de ducto biliar	0	0
Hígado: Hepatocitos	1-2	1
Hígado: Células de Kupffer	0	0
Pulmones: Epitelio de vías respiratorias	0	0
Pulmones: Macrófagos alveolares	2 (ocasional)- 3	2-3 (ocasional)
Pulmones: Otros	3	NA
Pulmones: Neumocitos	2-3 (ocasional)	2-3 (ocasional)
Ovarios: Folículo	2 (ocasional)	1-2
Ovarios: Estroma	1	1 (ocasional)
Páncreas: Epitelio acinar	0	1 (ocasional)
Páncreas: Epitelio ductal	0	0
Páncreas: Isletas de Langherans	0	0
Placenta: Estroma	0	0
Placenta: Trofoblastos	0	0
Próstata: Estroma fibromuscular	0	0
Próstata: Epitelio glandular	0	0
Músculo esquelético: Miocitos	0	0
Piel: Dermis	0	0
Piel: Epidermis	0	0
Intestino delgado: Epitelio	0	0
Intestino delgado: Ganglión	0	0
Intestino delgado: Compartimiento inflamatorio	0	0
Intestino delgado: Células de músculo liso	0	0

Inmunohistología de tejido humano normal con mAb 2.59.2 anti-TIM-1		
Tejido	Marcador	
	Espécimen 1	Espécimen 2
Bazo: Pulpa roja	0	2 (raros)
Bazo: Pulpa blanca	0	0
Estómago: Epitelio	0	0
Estómago: Células de músculo liso	0	0
Testículos: Células de Leydig	2	1-2
Testículos: Epitelio seminífero	1	2
Timo: Epitelio	0	0
Timo: Linfocitos	2 (raro)	2 (ocasional)
Tiroides: Epitelio folicular	0	0
Amígdalas: Epitelio	0	0
Amígdalas: Linfocitos	3 (ocasional)	2 (ocasional)
Útero: Endometrio	0	0
Útero: Miometrio	0	0

Ejemplo 8

Llenado de toxina mediado por anticuerpo

- 5 Se utilizó un ensayo clonogénico tal como se describe en el arte para determinar si los anticuerpos primarios pueden inducir la muerte de células cancerosas cuando se utilizan en combinación con un reactivo de anticuerpo secundario conjugado con toxina saporina. Kohls y Lappi, *Biotechniques*, 28(1):162-5 (2000).

Protocolo de ensayo

- 10 Se sembraron células ACHN y BT549 sobre placas de cultivo de tejido de fondo plano a una densidad de 3000 células por pozo. En el día 2 o cuando las células alcanzaron ~25% de confluencia, se agregaron 100 ng/pozo de toxina mAb secundaria (IgG-saporina antihumana de cabra; Advanced Targeting Systems; HUM-ZAP; cat. no. IT-22). Se agregó entonces un control positivo de anticuerpo anti-EGFR, mAb 2.7.2, mAb 2.59.2, o un isotipo mAb de control a cada pozo a la concentración deseada (típicamente 1 a 500 ng/mL). Al día 5, las células fueron tripsinizadas, transferidas a una placa de cultivo de tejido de 150 mm, e incubadas a 37°C. Las placas fueron examinadas diariamente. En los días 10-12, todas las placas fueron teñidas con Giemsa y se contaron las colonias sobre las placas. La eficiencia del sembrado fue determinada comparando el número de células antes de la transferencia a las placas de 150 mm con respecto al número de colonias que se formaron eventualmente.

- 20 El porcentaje de viabilidad en líneas celulares ACHN positivas al antígeno y BT549 negativas al antígeno se presenta en la figura 4 y en la figura 5, respectivamente. En este estudio, el reactivo de quimioterapia citotóxico 5 Flurouracilo (5-FU) fue utilizado como control positivo e indujo casi mortandad completa, mientras que el anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con saporina no tuvo efecto. Se utilizó un anticuerpo monoclonal (NeoMarkers MS-269-PABX) generado contra el receptor EGF expresado por ambas líneas celulares para demostrar la matanza específica del conjugado saporina-anticuerpo primario y anticuerpo secundario. Los resultados indican que ambas líneas celulares eran susceptibles a la matanza por toxina mediada por mAb de EGFR a 100

ng/mL. A la misma dosis, tanto el mAb 2.59.2 anti-TIM-1 y el mAb 2.70.2 anti-TIM-1 indujeron más de 90% de muerte de células ACHN en comparación con el 0% de muerte de células BT549.

Muerte mediada por conjugados anticuerpo toxina: Ensayo clonogénico

5 Se sembraron células CAKI-1 y BT549 sobre placas de cultivo de tejidos de fondo plano a una densidad de 3000 células por pozo. En el día 2 o cuando las células alcanzaron ~25% de confluencia, se agregaron a las células diversas concentraciones (típicamente 1 a 1000 ng/ml) de mAb no conjugado y conjugado con Auristatina E (AE), la cual incluía mAb anti-EGFR, mAb 2.7.2 anti-TIM-1, mAb 2.59.2 anti-TIM-1 o mAb isotipo de control. Cada uno de estos anticuerpos estaba conjugado a AE. El anticuerpo monoclonal (NeoMarkers MS-269-PABX) generado contra el receptor EGF, el cual es expresado por ambas líneas celulares, fue utilizado como control positivo para demostrar la muerte específica mediada por el anticuerpo conjugado con AE. En el día 5, las células fueron tripsinadas, transferidas a una placa de cultivo de tejido de 150 mm e incubadas a 37°C. Las placas fueron examinadas diariamente. En los días 10-12, todas las placas fueron teñidas con Giemsa y se contaron las placas sobre las colonias. La eficiencia del sembrado fue determinada contando las células antes de transferir a placas de 150 mm y comparando el número de colonias que se formaron eventualmente.

15 El porcentaje de viabilidad en las líneas celulares CAKI-1 positivas a antígeno y BT549 negativas a antígeno se presentan en las figuras 6 y 7, respectivamente.

Los resultados indican que los mAb de isotipo de control no conjugados y conjugados a AE no tuvieron efecto sobre el crecimiento de las células CAKI-1 y BT549. Sin embargo, ambas líneas celulares fueron susceptibles a la muerte por toxina mediada por mAb de AE-EGFR en una forma dependiente de la dosis. A la dosis máxima, ambas mAbs (2.59.2 y 2.70.2) anti-TIM-1 indujeron por encima del 90% de muerte de células CAKI-1 cuando se comparan con sus contrapartes no conjugadas. La respuesta fue dependiente de la dosis. En el mismo rango de dosis, ambas mAbs 2.59.2 y 2.70.2 anti-TIM-1 no afectaron la supervivencia de las células BT549.

Ejemplo 9

Ensayo de retardo de crecimiento de xenoinjerto de tumor humano

25 Se usa un modelo de inhibición del crecimiento tumoral de acuerdo con métodos de prueba estándar. Geran et al., Cancer Chemother. Rep. 3:1-104 (1972). Ratones genéticamente anulados atímicos (un/un) fueron implantados con células tumorales o fragmentos de tumor de un huésped existente, en particular, se usaron fragmentos tumorales de carcinoma renal (CaKi-1) u ováricos (OVCAR). Estos animales son tratados entonces con un conjugado de anticuerpo anti-TIM-1 e inmunotoxina, por ejemplo, conjugado mAb 2.70.2 AE en dosis que variaban desde 1 a 20 mg/kg de peso corporal, dos veces a la semana durante un período de 2 semanas. Se establece el volumen tumoral para los animales tratados y se compara con los tumores de control no tratados, determinando así el retardo en el crecimiento tumoral.

35 Después de alcanzar un volumen de 100 mm³ los animales son aleatorizados e identificados individualmente en grupos de 5 individuos por jaula. La proteína o el anticuerpo de interés se administran a través de rutas convencionales (intraperitoneal, subcutáneo, intravenoso o intramuscular) durante un período de 2 semanas. Dos veces a la semana, los animales son evaluados en cuanto al tamaño de los tumores utilizando calibreadores. Se registran diariamente los pesos de los animales individuales a lo largo del período de dosificación y dos veces a la semana después de este. El volumen tumoral se determina utilizando la fórmula: Volumen tumoral (en mm³) = (longitud x anchura x altura) x 0.536. Las determinaciones de volumen para los grupos tratados son comparadas con el grupo de control que porta tumor no tratado. La diferencia en tiempo para que los tumores tratados alcancen volúmenes específicos se calculan para 500, 1000, 1500 y 2000 mm³. Los pesos corporales son evaluados en cuanto a los cambios cuando se comparan con animales de control que llevan tumores no tratados. Los datos se presentan como crecimiento tumoral en volumen en representación gráfica contra el tiempo. Los pesos corporales para cada grupo experimental también se representan en forma gráfica.

45 Los resultados muestran que el tratamiento es bien tolerado por los ratones. El tratamiento con el conjugado mAb AE y anti-TIM-1 inhibe el crecimiento tumoral de tumores CaKi-1 y OVCAR establecidos.

Ejemplo 10

Tratamiento de carcinoma renal con anticuerpos anti-TIM-1

50 Un paciente que requería tratamiento para un carcinoma renal recibe una inyección intravenosa de anticuerpos anti-TIM-1 acoplados a un agente quimioterapéutico o agente radioterapéutico citotóxico. El progreso del paciente es monitorizado y se dan administraciones de anticuerpos anti-TIM-1 adicionales según sea requerido para inhibir el crecimiento del carcinoma renal. Siguiendo tal tratamiento, se disminuyó el nivel de carcinoma en el paciente.

Ejemplo 11

Análisis FACS de la expresión de la proteína TIM-1 en células CD4+ T

Se aislaron células mononucleares a partir de sangre humana diluida 1:1 en PBS, haciendo rotar en Ficoll durante 20 minutos. Las células mononucleares fueron lavadas dos veces a 1000 rpm con PBS -Mg y Ca y resuspendidas en regulador Miltenyi (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA); PBS, BSA al 0.5%, EDTA 5 mM a aproximadamente 10⁸ células/mL. Se agregaron 20 µL de perlas CD4 Miltenyi por 10⁷ células y se incubó durante 15 minutos sobre hielo. Las células fueron lavadas con un volumen en exceso de 10 veces de regulador Miltenyi. Una columna de selección positiva (tipo VS+) (Miltenyi Biotec Inc. Auburn, CA) fue lavada con 3 mL de regulador Miltenyi. Las células peletizadas fueron resuspendidas a 10⁸ células por mL de regulador Miltenyi y se aplicaron a la columna VS lavada. La columna fue lavada entonces tres veces con 3 mL de regulador Miltenyi. Después de esto, la columna VS fue retirada del campo magnético y se eluyeron las células CD4+ de la columna con 5 mL de regulador Miltenyi. Los linfocitos CD4+ aislados fueron convertidos en una pella y resuspendidos en DMEM al 5% FCS más aditivos (aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, mercaptoetanol, glutamina, penicilina y estreptomycin) a 10⁶ células/mL. 1x10⁶ células recién aisladas con carencia de CD4+ fueron transferidas a tubos de citometría de flujo y lavadas 2 veces con 2 mL/tubo de regulador de tinción FACS (FSB) que contenía PBS, BSA al 1%, y NaN3 al 0.5%. Las células fueron sometidas a rotación y se retiró el sobrenadante. Las células fueron bloqueadas con 20% de suero de cabra en FSB durante 30 minutos sobre hielo. Las células fueron lavadas como se indicó arriba y se incubaron con 10 µg/mL de mAb humano primario anti-TIM-1 o mAb PK16.3 de control en FSB (200 µL) durante 45 minutos sobre hielo seguido por lavado. Se agregó anticuerpo conjugado PE anti-humano de cabra a una dilución de 1:50 durante 45 minutos sobre hielo en la oscuridad, se lavó, se resuspendió en 500 µL de PBS que contenía 1% de formaldehído y se mantuvo a 4°C hasta que se llevó a cabo la citometría de flujo.

El análisis de FACS fue llevado a cabo para determinar la expresión de la proteína TIM-1 tal como se detectó con cinco anticuerpo monoclonales anti-TIM-1 (2.59.2, 1.29, 2.70.2, 2.56.2, 2.45.1) sobre células CD4+ T en reposo humanas y de ratón, así como en células CD4+ T humanas activadas y humanas polarizadas. Estos análisis demostraron que las células CD4+ T humanas en reposo recién aisladas no expresan TIM-1 mientras que una fracción principal de células Th2 y Th1 humanas polarizadas expresan TIM-1.

El análisis de FACS sobre la expresión de la proteína TIM-1 sobre células CD4+ Th2 humanas utilizando cinco anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 se muestra en la Tabla 13. El experimento está descrito en la columna de la izquierda y el anticuerpo marcado está especificado a lo largo de la fila superior. Los datos se reportan como la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia.

Tabla 13

Análisis FACS de la expresión de la proteína TIM-1 sobre células CD4+ Th2 humanas						
Experimento	Media geométrica de intensidad de fluorescencia					
	Control PK16.3	mAb anti-TIM-1				
		1.29	2.45.1	2.56.2	2.59.2	2.70.2
Células CD4+ T humanas en reposo	4.6	4.7	5.1	6	4.9	N/A
Células CD4+ Th2 humanas polarizadas	8.4	22.3	42.4	564.1	22	27.8

La Tabla 14 demuestra que en el transcurso de 5 días, el estímulo continuo de las células T da como resultado un incremento de la expresión de TIM-1, medido por el mAb 2.70.2 anti-TIM-1, en comparación con el anticuerpo de control PK 16.3. Adicionalmente, la adición del inhibidor de la matriz de metaloproteínasa (MMPI) no incrementó de manera medible la expresión de TIM-1, demostrando que el receptor no se desprende de las células T bajo estas condiciones experimentales. Así, la expresión de la proteína TIM-1 y el enlazamiento del anticuerpo específico son específicos para células Th1 y Th2 activadas, las cuales a su vez, son características de la respuesta inflamatoria, específicamente asma.

Tabla 14

Porcentaje de células T activadas que expresan TIM-1		Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 5
Control PK16.3	-MMPI	1	3	3	1	1
	+ MMPI	1	2	6	2	2
TIM-1 2.70.2	MMPI	1	8	10	5	13
	+MMPI	1	10	14	10	19

Ejemplo 12

Ensayos de citoquina

- 5 Los niveles de producción de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, e IFN γ por células Th1 y Th2 activadas fueron medidos en sobrenadantes de cultivo tratados con anticuerpos anti-TIM-1 utilizando protocolos de ELISA. La producción de citoquinas por células Th1 o Th2 tratadas con anticuerpos anti-TIM-1 fue comparada con las células Th1 o Th2 tratadas con el anticuerpo de control PK16.3. Además, las siguientes muestras fueron analizadas en paralelo como
- 10 controles internos: i) células Th1 o Th2 tratadas con anti-CD3, donde no se espera producir citoquina por la ausencia de coestimulación, ii) células Th1 o Th2 estimuladas anti-CD3/anti-CD28, de las que se espera muestre producción de citoquina detectable, y iii) células Th1 o Th2 no tratadas. Las células CD4+ T fueron aisladas como se describe en el Ejemplo anterior. Los linfocitos de CD4+ aislados fueron sometidos a precipitación y resuspendidos en DMEM al 5% de FCS más aditivos (aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, mercaptoetanol, glutamina, penicilina y estreptomycin) a 10⁶ células/mL. Las placas de cultivo sin tejidos Falcon de 6 pozos fueron precubiertas durante la
- 15 noche con anti-CD3 (2 μ g/mL) y anti-CD28 (10 μ g/mL) (600 μ L total en PBS de Dulbecco) durante la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas con PBS y se suspendieron linfocitos de CD4+ a 500,000 células/mL en el medio con Th2: DMEM+ FCS al 10% más suplementos e IL-2 5 ng/mL, IL-4 5 ng/mL, anti-IFN gamma 5 μ g/mL y las células fueron estimuladas de 4-6 días a 37°C y CO2 al 5% en la presencia de 5 μ g/mL de mAb que reconoce la proteína TIM-1 o el control negativo mAb PK16.3 de isotipo coincidente.
- 20 En otro conjunto de experimentos, se suspendieron linfocitos CD4+ a 500,000 células/mL en medio Th1: DMEM+ FCS al 10% más suplementos e IL-2 5 ng/mL, IL-12 5 ng/mL, anti-IL-4 5 μ g/mL y se estimularon durante 4-6 días a 37°C de temperatura y CO2 al 5% en la presencia de 5 μ g/mL de TIM-1 o mAb PK16.3 de control de isotipo coincidente. Las células fueron lavadas dos veces en DMEM y resuspendidas en DMEM, FCS al 10% más
- 25 suplementos y 2 ng/mL de IL-2 (500,000 células/mL) en la presencia de 5 μ g/mL de TIM-1 o mAb PK16.3 de control y se cultivaron (en reposo) durante 4-6 días a 37°C y CO2 al 5%. El proceso de activación y reposo fue repetido al menos una vez más tal como se describió más arriba con la adición de anti-CD95L (ligando anti-FAS) para evitar la apoptosis de células mediada por FAS. Las placas tratadas con cultivo sin tejido de Falcon de 96 pozos precubiertas durante la noche con mAb anti-CD3 a 500 ng/mL y la molécula coestimuladora B7H2 (homólogo 2 de B7) a 5 μ g/mL fueron lavadas y se agregaron 100 μ L de Th1 o Th2 tratadas con mAb de TIM-1 (200,000 células) por pozo.
- 30 Después de 3 días de cultivo, los sobrenadantes fueron retirados y se determinaron los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, e IFN γ por ELISA (Pharmingen, San Diego, CA o R&D Systems, Minneapolis, MN).
- 35 Tal como se demuestra a continuación, el mAb anti-TIM-1 inhibe significativamente la liberación de la citoquinas probadas por las células Th1 y Th2 (véanse figuras 8-17). Los resultados en donde la inhibición de la producción de citoquina es significativa ($p=.02-.008$), están marcadas en las gráficas de barras con un asterisco. Las Tablas 15 y 16 resumen las gráficas de barras en las figuras 8-17.

Tabla 15

<u>Inhibición de citoquinas en células CD4+ Th1 utilizando anticuerpos anti-TIM-1 en dos donantes humanos independientes.</u>						
Los experimentos que demuestran inhibición significativa de la producción de citoquina están marcados con un asterisco: P= 0.01 a 0.05 *; P=0.005 a 0.009 **; P=0.001 a 0.004 ***						
Donante 12+17		Porcentaje de anticuerpo de control				
TH1	Citoquinas mAbs anti-TIM-1	IL-5	IL-4	IL-10	IL-13	INF _γ
	2.56.2	100.17	28.49*	63.76*	86.45	93.69
	2.45.1	90.23	39.78*	83.98	96.25	100.6
	1.29	94.63	81.05	60.77**	73.95***	93.51
	2.59.2	66.62*	31.40*	68.99*	54.5***	128.12

Tabla 16

<u>Inhibición de citoquinas en células CD4+ Th1 utilizando anticuerpos anti-TIM-1 en dos donantes humanos independientes.</u>						
Los experimentos que demuestran inhibición significativa de la producción de citoquina están marcados con un asterisco: P= 0.01 a 0.05 *; P=0.005 a 0.009 **; P=0.001 a 0.004 ***						
Donante 12+17		Porcentaje de anticuerpo de control				
TH2	Citoquinas mAbs anti-TIM-1	IL-5	IL-4	IL-10	IL-13	INF _γ
	2.56.2	112.07	103.46	93.97	86.45	88.30
	2.45.1	148.7	25.66***	55.97*	86.81	25.66*
	1.29	80.26	112.54	44.45*	48.91**	112.54
	2.59.2	23.62*	19.17**	43.86*	43.71***	19.18*

- 5 Un resumen de los datos de inhibición de citoquina en Th2 obtenidos a partir de experimentos múltiples con diferentes donantes se provee en la Tabla 17. Cada experimento utilizó células CD4+ purificadas aisladas a partir de muestras de sangre entera de dos donantes independientes. La producción de citoquina está reportada como el porcentaje de producción de citoquina detectado utilizando la mAb PK16.3 de control. La mAb anti-TIM-1 utilizada en cada experimento esta especificada a lo largo de la fila inferior. Los resultados que reportan inhibición de citoquinas significativas están subrayados en la Tabla 17 a continuación. El uso de "ND" indica que el experimento no se llevó a cabo. Estos resultados reflejan efectivamente la variabilidad dependiente del donante pero muestran que las mAbs 2.59.2 y 1.29 bloquean de manera reproducible una o más de las citoquinas de Th2.
- 10

Tabla 17

<u>Resumen de inhibición de citoquina utilizando las mAbs anti-TIM-1 2.59.2 y 1.29 en 5 grupos de donantes humanos independientes</u>					
Los resultados de los experimentos que reportan inhibición superior al 50% de la vista utilizando el anticuerpo de control PK16.3 están subrayados					
ID de citoquina de donante	12+17	12+14	13+14	14	12
IL-4	<u>19</u>	626	130	ND	ND
IL-5	<u>24</u>	5	122	67	2
IL-10	44	83	<u>19</u>	<u>45</u>	109
IL-13	<u>44</u>	ND	<u>17</u>	100	91
	mAb anti-TIM-1 2.59.2	mAb anti-TIM-1 1.29			

Ejemplo 13

Construcción, expresión y purificación de scFv anti-TIM-1.

- 5 Los dominios VL y VH de la mAb 2.70 fueron utilizados para hacer un constructo scFv. La secuencia del scFv anti-TIM-1 fue sintetizada por métodos conocidos en el arte.

La secuencia de nucleótidos de scFv anti-TIM-1 es como sigue:

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGC
 CGGCCATGGCCGATAATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCC
 TGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGAT
 GATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG
 CTCCTGATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTG
 GCAGTGGGTTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGG
 ATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCA
 AGGGACACGACTGGAGATTAACCTTCCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGC
 GAAGAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTCCAGGTGCAGC
 TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
 GTGCAGCGTCTGGATTCATCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
 TCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAA
 ACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA
 GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
 TTAAGTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGGGGTTTACTAC
 TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCCGTCTCCTCAGCTAGCGATTATAAGGACGAT
 GATGACAAATAG (SEQ ID NO:108)

- 10 La secuencia de aminoácidos del scFv anti-TIM-1 maduro es como sigue:

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSRSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLSY
 RASGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRVEFPITFGQGTRLEIKLSAD
 DAKKDAAKKDDAKKDDAKKDLQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYGM
 HWVRQAPGKGLKVVAVIWIYDGSNKLKADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE
 DTAIVYYCARDYYDNSRHHWGFQYWGQGLVTVSSASDYKDDDDK (SEQ ID
 NO:109)

El ADN sintetizado puede ser insertado en el vector de expresión pET-20(+), para expresión periplásmica en *E.coli*. Las células son cultivadas y las proteínas periplásmicas se preparan utilizando protocolos estándar. La purificación del scFv anti-TIM-1 se logra utilizando una columna de afinidad anti-FLAG M2 según las instrucciones del fabricante.

5 El peso molecular predicho de la proteína madura es 30222.4 daltons. Este scFv purificado es utilizado en los ensayos descritos más adelante para probar la actividad biológica. El constructo de scFv comprende un péptido de señalización (SP), VL (VL1) derivado de mAb 2.70, un enlazante (L4) basada en el enlazante 205C de 25 aminoácidos, el VH (VH1) derivado de mAb 2.70, y una etiqueta (en este caso la etiqueta FLAG). Será obvio para los experimentados en el arte que pueden utilizarse otras secuencias de SP, enlazante y etiqueta para obtener la misma actividad que la del anticuerpo scFv anti-TIM-1 descrito aquí.

Ejemplo 14

Construcción, expresión y purificación de scFv1 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3

La fórmula básica para la construcción de esta proteína terapéutica es como sigue:

SP1 – VL1 – L1 – VH1 – L2 – VH2 – L3 – VL2 – Etiqueta

15 El péptido de señalización SP1 es el mismo que el péptido de señalización IgG kappa VKIII A 27 de Medical Research Council (MRC) Centre for Protein Engineering, University of Cambridge, Reino Unido.

Pueden utilizarse también otros péptidos de señalización y esto será obvio para los experimentados en el arte. Está proteína está diseñada para ser expresada a partir de células de mamíferos. El peso molecular predicho de la proteína escindida madura es 54833.3 dalton. L1 corresponde al enlazante (Gly4Ser)₃, mientras que el enlazante 2 (L2) corresponde a la secuencia enlazante corta: GGGGS. L3 es un enlazante de 18 aminoácidos. VH2 corresponde al dominio de cadena pesada variable anti-CD3 de Genbank (número de acceso CAE85148) mientras que VL1 corresponde al dominio de cadena liviana variable anti-CD3 de Genbank (número de acceso CAE85148). La etiqueta que está siendo usada para este constructo es una etiqueta His para facilitar la purificación y detección de esta proteína novedosa. Se utilizan protocolo estándar para expresar y purificar esta proteína etiquetada con His, la cual es probada en cuanto a su actividad y mortandad en células tumorales en los protocolos descritos a continuación.

La numeración de aminoácidos y ácidos nucleicos para los componentes que comprenden el scFv1 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3 es como sigue:

SP: -20 a -1 aa; -60 a -1 nt

30 VL1: 1-113 aa; 1-339nt

L1: 114-128 aa; 340-384nt

VH1: 129-251 aa; 385-753nt

L2: 252-256 aa; 754-768nt

VH2: 257-375 aa; 769-1125nt

35 L3: 376-393 aa; 1126-1179nt

VL2: 394-499 aa; 1180-1497nt

Etiqueta: 500-505 aa; 1498-1515nt

La secuencia de nucleótidos del scFv1 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3 es como sigue:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA
 CCGGAGATATTGTGATGACCCAGACTCCAETCTCCCTGCCCGTCAACCCTGGAGA
 GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGA
 AACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTG
 ATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTG
 GGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTG
 GAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTCTATCACCTTCGGCCAAGGGAC
 ACGACTGGAGATTAAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGG
 TGTTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCATCTTCAGTCGCTATGGCATG
 CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGG
 TATGATGGAAGTAATAAACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT
 CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
 AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATC
 ACTGGGGGTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCCCGTCTCCTCAGGAG
 GTGGTGGATCCGATATCAAAGTGCAGCAGTCAAGGGCTGAACTGGCAAGACCTG
 GGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTACTAGGTACAC
 GATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACAT
 TAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCAC
 ATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC
 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGC
 CTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGTCGAAGGTGGA
 AGTGGAGGTTCTGGTGAAGTGGAGGTTCAAGTGGAGTCGACGACATTCAGCTG
 ACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCT
 GCAGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCA
 CCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTTA
 TCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAATCAGCAGCATG
 GAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCTC
 ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAATAG (SEQ ID NO:110)

La secuencia proteínica del scFv1 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3 maduro es como sigue:

DIVMTQTPLSLPVTPEPASPISCRSSRSLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTL
 RASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRVEFPITFGQGRLEIKGGG
 SGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRVGMHWVRQAPGKGL
 KWVAVIWYDGSNKLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY
 YDNSRHHWGFYWGQGLVTVSSGGGSDIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGY
 TFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQL
 SSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDI
 QLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVP
 YRFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
 NO:111)

5 Ejemplo 15

Construcción, expresión y purificación de scFv2 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3:

La fórmula básica para la construcción terapéutica de una nueva proteína es como sigue:

SP1 – VL1 – L4 – VH1 – L2 – VH2 – L4 – VL2 – Etiqueta

5 El péptido de señalización SP1 es el péptido de señalización de IgG kappa VKIII A 27 de Medical Research Council (MRC) Centre for Protein Engineering, University of Cambridge, Reino Unido. Para más información véase mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php?menu=901. Podrían usarse también otros péptidos de señalización y enlazantes para obtener anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos biológicamente activos adicionales. La proteína que está siendo descrita en este ejemplo, también está diseñada para ser expresada a partir de células de mamíferos y es similar al scFv1 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3, excepto en que utiliza un enlazante diferente tal como se indica en la fórmula básica más arriba (L4, como se describió anteriormente) y que se utiliza una etiqueta Flag en vez de la etiqueta His del primer ejemplo.

10 El peso molecular predicho de la proteína escindida madura es 58070.0 dalton. La etiqueta que está siendo usada para este constructo es una etiqueta FLAG para facilitar la purificación y detección de esta proteína novedosa. Se utilizan protocolos estándar para expresar esta proteína secretada y purificarla, la cual es probada en cuanto a su actividad y mortandad de células tumorales en los protocolos descritos a continuación.

La numeración de aminoácidos y ácidos nucleicos para los componentes que comprenden el scFv2 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3 es como sigue:

15 SP: -20 a -1 aa; -60 a -1nt

VL1: 1-113 aa; 1-339nt

L1: 114-138 aa; 340-414nt

VH1: 139-261 aa; 415-783nt

L2: 262-266 aa; 784-798nt

20 VH2: 267-385 aa; 799-1155nt

L3: 386-410 aa; 1156-1230nt

VL2: 411-516 aa; 1231-1548nt

Etiqueta: 517-524 aa; 1549-1572nt

La secuencia de nucleótidos de scFv2 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3 es como sigue:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA
 CCGGAGATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
 GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGA
 AACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTG
 ATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTG
 GGTGAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTG
 GAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGAC
 ACGACTGGAGATTAACCTTTCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAAGAA
 AGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGCAGGTGCAGCTGGTGG
 AGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
 CGTCTGGATTCATCTTCAAGTCGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
 CAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACTCTA
 TGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
 GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
 TCGGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGGGGTTTACTACTGGGG
 CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCGATATCAAAT
 GCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTG
 CAAGACTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAG
 GCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACT
 AATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCC
 AGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATT
 ACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
 CACTCTCACAGTCTCCTCACTTTCGCGGACGATGCGAAAAAGGATGCTGCGAA
 GAAAGATGACGCTAAGAAAGACGATGCTAAAAAGGACCTGGACATTCAGCTGAC
 CCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
 AGAGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACC
 TCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTTATC
 GCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGA
 GGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGGAGTAGTAACCCGCTCAC
 GTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGATTATAAGGACGATGATGACAA
 ATAG (SEQ ID NO:112)

La secuencia proteínica del scFv2 biespecífico anti-TIM-1 y anti-CD3 es como sigue:

DIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSRSLDSDDGNTYLDWYLQKP

GQSPQLLIYTLASYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRVEFPITF
 GQGRLEIKLSADDAKKDAKKDDAKKDLQVLVESGGGVVQPGRSLRLS
 CAASGFIFSRYGMLHWVRQAPGKGLKWVAVIWYDGSNKLYADSVKGRFTISRDNK
 NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDYYDNSRHHWGFYWGQGLVTVSSGGGGSDI
 KLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGGLEWIGYINPSRGT
 NYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGT
 TLTVSSLSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDLIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRA
 SSSVSYMNWYQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVVPYRFSGSGSGTSSYSLTSSMEAEDA
 ATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKDYKDDDDK (SEQ ID NO:113)

5

Ejemplo 16

Actividad biológica de la especie scFv anti-TIM-1

Análisis por ELISA:

5 Para determinar si los anticuerpos scFv1 y scFv2 biespecíficos anti-TIM-1 y anti-CD3 se enlazan a un antígeno específico, se lleva a cabo un análisis por ELISA. 1 ug/ml de antígeno específico (antígeno de TIM-1 (CG57008-02) es enlazado a placas de ELISA durante la noche en regulador de carbonato/bicarbonato (pH aproximadamente 9.2-9.4). Las placas son bloqueadas con regulador diluyente de ensayo adquirido de Pharmingen San Diego, CA), y se agregan diversas concentraciones de los anticuerpos biespecíficos scFv anti-TIM-1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan las placas en Tween 20 al 0.01% en PBS, seguido por la adición de mAb conjugado a HRP a la etiqueta 6-His (Invitrogen, Carlsbad, CA) o a la etiqueta de péptido FLAG o (Sigma, St. Louis, MO) en diluyente de ensayo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se desarrolla color con el sustrato TMB (Pharmingen) y la reacción se detiene con H₂SO₄. Las placas son leídas a A450 nm, y el valor O.D. se toma como una medida de enlazamiento proteínico.

Análisis de FACS

15 El enlazamiento de los anticuerpos scFv1 y scFv2 biespecíficos anti-TIM-1 y anti-CD3, así como del anticuerpo scFv anti-TIM-1 a células que expresan los antígenos reconocidos por la mAbs humana anti-TIM-1 es examinado por análisis de FACS. Se lavan células (tales como ACHN) en PBS y se resuspenden en regulador FACS consistente de PBS enfriado con hielo con la adición de BSA al 1% o FBS al 1%. Las células resuspendidas son incubadas entonces sobre hielo a diversas concentraciones del anticuerpo biespecífico durante 30 minutos. Las células son lavadas para eliminar el anticuerpo no enlazado. El anticuerpo enlazado es detectado por el enlazamiento de una mAb marcada secundaria (marcada con ficoeritrina o FITC) que reconoce específicamente la etiqueta 6-His o la etiqueta FLAG que está manipulada en la secuencia del anticuerpo biespecífico. Las células son lavadas y analizadas en cuanto al enlazamiento de la mAb anti-etiqueta por análisis de FACS. El enlazamiento de la mAb biespecífica más la mAb anti-etiqueta es comparado al enlazamiento de la mAb anti-etiqueta sola.

Análisis de citotoxicidad

25 Para determinar si el anticuerpo biespecífico tiene una actividad funcional según se define por la capacidad del biespecífico para dirigir las células T a la expresión normal de TIM-1 o células tumorales, el anticuerpo biespecífico es probado en un ensayo de Citotoxicidad. Se obtuvieron células T a partir de las células de baja densidad derivadas de la centrifugación de sangre sobre el medio de separación por densidad (densidad específica 1.077). Las células T pueden ser utilizadas en una mezcla heterogénea a partir de la fracción celular mononuclear de sangre periférica (la cual también contiene células B, células NK y monocitos) o purificada posteriormente a partir de las células de baja densidad utilizando la separación MACS y la selección positiva o negativa. La mortandad en los ensayos con células T derivadas de sangre directamente tendrá menos actividad citolítica que las células que han sido estimuladas *in vitro* con PHA, citoquinas, anticuerpos monoclonales activadores u otros estimulantes de la activación de células T policlonales. Por lo tanto, estos activadores serán utilizados para fortalecer adicionalmente la actividad de las células T en los ensayos funcionales. Hay disponibles muchas variaciones de ensayos de citotoxicidad. Los ensayos de citotoxicidad miden la liberación de productos naturales del metabolismo celular por lisis, tales como LDH. Otros ensayos están basados alrededor de la marcación de células con diversos agentes tales como cromo radioactivo (51Cr), DELFIA BATDA, CSFE o agentes marcadores similares y detectar la liberación o cambio en las células vivas enlazadas por el agente.

40 Los ensayos de citotoxicidad DELFIA (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc. Boston, MA) ofrecen un método no radiactivo para ser usado en los estudios de citotoxicidad mediada por células. El método se basa en cargar células con un éster de acetoximetilo de un ligando que potencia la fluorescencia. Después de que el ligando ha penetrado la membrana celular los enlaces éster son hidrolizados dentro de la célula para formar un ligando hidrofílico, el cual no pasa ya a través de la membrana. Después de la citólisis el ligando liberado es introducido en una solución de europio para formar un quelato fluorescente. La señal medida se correlaciona directamente con la cantidad de células lisadas. Las células objetivo son resuspendidas a una concentración de 2×10^6 /ml. Se mezclan 10 μ l de DELFIA BATDA en un tubo con 2 ml de células objetivo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agregan diversas concentraciones de células T a una concentración fija de células objetivo marcadas (5000 células por pozo) en placas con fondo en U de 96 pozos, y se incubaron durante al menos 2 horas a 37°C. Las placas son centrifugadas a aproximadamente 200 g, seguido por la aspiración de 20 μ l de sobrenadante, el cual fue agregado entonces a una solución de europio (200 μ l) en una placa separada. La placa se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguida por análisis sobre un SAFIRE (Tecan, Maennedorf, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales en los pozos de prueba son comparadas a las señal en un pozo de lisis al 100% (regulador de lisis al 10% en lugar de células T) y células con medio solo (liberación espontánea), y se calcula un porcentaje de lisis específico a partir de la fórmula

$$\text{Porcentaje de lisis específico} = (\text{prueba} - \text{liberación espontánea}) / 100\% \text{ lisis} \times 100$$

Análisis cinético BIAcore de constructos scFv

5 Las mediciones cinéticas para determinar la afinidad para los constructos scFv (monómeros así como biespecíficos que contiene al menos una unidad estructural scFv que se enlaza a TIM-1) se miden utilizando los métodos descritos anteriormente para anticuerpos completos de esta invención. Las afinidades proteínicas del anticuerpo que contiene scFv a TIM-1 se esperan dentro de un factor de 10, esto es, entre 0.271-27.1 nm, de la afinidad dada para mAb 2.70.

Ejemplo 17

Capacidad del mAb anti-TIM-1 para inhibir la proliferación de células de carcinoma de ovario humano

10 Se aislaron varios clones de anticuerpos monoclonales completamente humanos a partir de las inmunizaciones descritas más arriba y se analizó su capacidad para inhibir el potencial proliferativo de células OVCAR-5 (carcinoma de ovario humano) utilizando el ensayo de incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 01/25433).

15 En el ensayo de BrdU, se cultivaron células de cáncer OVCAR-5 (Manassas, VA) en Dulbeccos Modification of Eagles Medium (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% o suero de ternera al 10% respectivamente. La línea celular de cáncer de ovario fue cultivada hasta confluencia a 37°C en 10% de CO₂/aire. Las células fueron entonces mantenidas sin alimentación en DMEM durante 24 horas. El medio condicionado enriquecido fue agregado (10 µL/100 mL de cultivo) durante 18 horas. Se agregó entonces BrdU (10 µM) y se incubó con las células durante 5 horas. La incorporación de BrdU fue probada por inmunoensayo colorimétrico de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

20 La capacidad de diversos anticuerpos monoclonales humanos anti-TIM-1 para neutralizar fue establecida. Los resultados provistos en las figuras 18A-17T se presentan en un formato de gráfica de barras para ayudar en la comparación de los niveles de la incorporación de BrdU en células OVCAR5 por exposición a diversos anticuerpos monoclonales humanos anti-TIM-1 descritos aquí. Como controles positivo y negativo, se cultivaron células OVCAR5 en la presencia de sus medios completos (completo) o medios restringidos en contenido de suero (sin nutrición).
25 Además, el anticuerpo monoclonal PK16.3 fue incluido como un control de tratamiento negativo representando un anticuerpo humano IgG de especificidad irrelevante. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-TIM-1 descritos aquí fueron utilizados en dosis variables (10-1000 ng/mL) en comparación con un control corrido utilizando concentraciones variables.

Ejemplo 18

30 Estudios conjugados de anticuerpos

Estudios adicionales de conjugados de anticuerpos fueron llevados a cabo utilizando la toxina vegetal saporina conjugada al mABs específico de anti-TIM-1 (1.29 y 2.56.2) y diversos anticuerpos irrelevantes, incluyendo, PK16.3 (figuras 19A-19C). Controles negativos adicionales incluyeron mAb 2.56.2 específico anti-TIM-1 y el anticuerpo irrelevante PK16.3 sin toxina (figura 19D). Se trataron cuatro líneas celulares, tres líneas celulares de cáncer de riñón (ACHN, CAKI, y 786-O) y una línea celular de cáncer de mama (BT549), durante 72 horas con conjugados saporina-anticuerpo o anticuerpos solos, tiempo después del cual se agregó BrdU para monitorizar la proliferación durante un período de 24 horas. Los resultados se describen en las figuras 19A-20C para las líneas celulares de cáncer de riñón y en la figura 19D para la línea celular de cáncer de mama. Todas las tres líneas celulares de cáncer de riñón fueron sensibles al tratamiento con los conjugados saporina-anticuerpo específico de TIM-1 como se evidencia mediante un descenso medible en la incorporación de BrdU. El tratamiento de las mismas líneas celulares con anticuerpos irrelevantes conjugados tuvo poco o ningún efecto demostrando los efectos antiproliferativos dependientes del antígeno. Los mismos estudios llevados a cabo con la línea celular BT549 mostraron que el anticuerpo 2.56.2 específico de TIM-1 no mostró efecto antiproliferativo ni solo ni conjugado con saporina. Los controles negativos para estos estudios parecen trabajar bien sin efectos citotóxicos.

Ejemplo 19

Secuencias

A continuación se presentan secuencias relacionadas con los anticuerpos monoclonales contra TIM-1. Con respecto a las secuencias de aminoácidos, la negrilla indica regiones marco, el subrayado indica regiones CDR, y las *cursivas* indican regiones constantes.

50 mAb 1.29 anti TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5'TGGGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCC
 TTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGT
 GGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATT
 GGGTTTATCTATTACACTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAG
 TCTCCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGT
 GACCGCTGCGGACGCGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTATGACTGGAGCTT
 CCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
 AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACCTCAGGCGCTCT3' (SEQ ID NO:1)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 1:

WVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWSWIRQPPGKGLEWI
GFYYTGSTNYNPSLKSRSVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADA AVYYCARDYDWSFH
FDYWGOGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 5 (SEQ ID NO:114)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5'CAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGTGACATCCAG
 ATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCA
 CTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAAC
 CAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG
 TCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAAATCA
 GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTA
 CCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGC
 ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC
 TCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
 AGGTGGATAACGCC3' (SEQ ID NO:3)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 3:

QLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASIGDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPG
KAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLOHNSYPLTF
GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA (SEQ
 10 ID NO:115)

mAb 1.37 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5' CAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTACTAACTATTGGATG
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATACAG
CAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGGCCGATTCACCATC
TCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACTCGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGGGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGC
CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCGAACC GG TGAGCGGTGTCGTGGAAC3' (SEQ ID NO:5)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 5

QCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYWMSWVRQAPGKGLEWVANI
QODGSEKYYVDSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDSAVYYCARWDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVSGVVE (SEQ ID
NO:116)

- 5 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5' CTTCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCTGGATCCAGTGGGGATATTGTGATG
ACCCAGACTCCACTCTCCTCAACTGTCATCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCT
GCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTTGAATTGGC
TTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATATGATTTCTAACCG
GTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATTTAC
ACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCA
AGCTACAGAATCTCCTCAGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG
AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGGGCCTCTGTTG3' (SEQ ID NO:7)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 7:

10 LLGLLMLWVPGSSGDIVMTQTPLSSTVILGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQ
RPGQPPRLLIYMISNRFSGVPDRFSGSAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATE
SPQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGRASV (SEQ ID NO:117)

mAb 2.16 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y de una porción de constante:

5'GAGCAGTCGGGGGGAGGCGTGGTAAAGCCTGGGGGGTCTCTTAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACGCCTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAGGAGAACTGATGGTGGG
ACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGAT
TCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAAACGAGGACACAGCC
GTGTATTACTGTACCTCAGTCGATAATGACGTGGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGC
CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT3' (SEQ ID NO:9)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 9:

XXXXEQSGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMTWVRQAPGKGLEWVGRIKR
RTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNNLKNEDTAVYYCTSVDNDVDY
WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
VHTFPAVLQSSGL (SEQ ID NO:118)

5 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5'CTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATC
TCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATT
GGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAA
TCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT
ACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATATTGGTCTTTATTACTGCATGC
AAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGACATCAAAC
GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCC
AAAGTACAG3' (SEQ ID NO:11)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 11

XXXLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDIGLYYCMQALQTPLTFGGGTKVDI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ (SEQ ID NO:119)

10 mAb 2.17 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada y una porción de la región constante:

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
 GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACCTATAGCATGAACTGG
 GTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGAAGTAGT
 ACTAGTACCATATACTATGCAGAGTCCCTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGCG
 ACAATGCCAAGAATTCACTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACA
 CGGCTGTGTATTACTGTGCGCGGGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
 CACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
 TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC
 TCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
 CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA3' (SEQ
 ID NO:13)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por
 SEQ ID NO: 13:

QVQLEQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMNWVRQAPGKGLEWVSYIRSS
TSTIYYAESLKGRFTISSDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDFDYWGQGL
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLS (SEQ ID NO:120)

5 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5' GAAATCCAGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCG
 GCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAGACACCT
 ACTTGAATTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAA
 GATTTCTACCCGGTTCTCTGGGGTCCCTGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGG
 ACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGACTGACGATGTCGGGATTTAT
 TACTGCATGCAAACACAAATTCCTCAAATCACCTTCGGCCAAGGGACACGA
 CTGGAGATTAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG
 ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
 TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA3'
 (SEQ ID NO:15)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por
 SEQ ID NO: 15:

EIQLTQSPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGDTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKIS
TRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEITDDVGIYYCMQTTQIPQITFGQGTRLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG (SEQ ID
 NO:121)

10 mAb 2.24 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5' CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
 GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGG
 GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
 GGAAGTAATAAACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
 GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
 ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGG
 GGTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAA
 GGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACA
 GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
 GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGT
 CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA (SEQ ID NO:17)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 17:

QVQLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLKWVAVIW
YDGSNKLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYDNSRH
HWGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL (SEQ ID NO:122)

5 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5' GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
 GTCACCATCACTTGCCGGCAAGTCAGAGTATTTATAGTTATTTAAATTGGTATC
 AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC
 AAAGTGGGGTCCCATCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
 CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGT
 TACAGTACCCCTCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGAACT
 GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
 ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA3' (SEQ ID NO:19)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 19:

DIQL/MT/LQSPSSLSASV GDRVTITCRASOSIYSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGS GDTFTLTISSLQPEDFATYYCQOQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG (SEQ ID NO:123)

10 mAb 2.45 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5' CAGTCGGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGC
 AGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACGCCTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAGGAAA ACTGATGGTGGGAC
 AACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTC
 AGAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGGAAACCGAGGACACAGCCGT
 GTATTACTGTACCACAGTCGATAACAGTGGTACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
 GGTACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC
 TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC

**TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTCT3' (SEQ ID NO:21)**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 21:

**XXXXXQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMTWVRQAPGKGLEWVGRJKR
KTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSENTLYLQMNSLETEDTAVYYCTTVDNSGDY
WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLS (SEQ ID NO:124)**

5) Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

**5'ACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCC
TGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGT
ACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCG
GGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTAC
ACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCA
AGCTCTACAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACG
AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCA3' (SEQ ID NO:23)**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 23:

**XXXXTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGGGTKVEI
KRTVAAPSVPFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYKQVQWKVDNAL (SEQ ID NO:125)**

10) mAb 2.54 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

**5'CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCGGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCACTAACTATGGCTTGCAGTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGATTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTCATAAATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACGCTCTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTACGCGAGATCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCT
GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG
TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC3' (SEQ
ID NO:25)**

15) Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 25:

QVQLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTNYGLHWVRQAPGKGLDWVAVIWY
DGSHKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCTRDL DYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
AVLQSSGLYSL (SEQ ID NO:126)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5'GAAACGCAGCTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
 AGTCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACA ACTACTTAGCCTGG
 TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCA
 GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA
 CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTGTGCAGAGTGTTACTGTCAGCA
 ATATGGTAGCTCACTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
 ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
 CCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA3' (SEQ ID
 NO:27)

5 Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por
 SEQ ID NO: 27:

ETQLTQSPGTLSPGERVTLSCRASOSVSNNYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDCAECYCOQYGSSPLTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWEGGITPSNRV (SEQ ID
 NO:127)

mAb 2.56 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5'GTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG
 GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGC
 ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATA
 TGGTATGATGGAAGTCATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC
 ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
 GCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTCTGCGAGAGATTACTATGATACGAGTCCG
 CATCACTGGGGGTTTGA CTGETGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCTG
 CTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTC
 CGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
 GACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGC3
 ' (SEQ ID NO:29)

10 Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por
 SEQ ID NO: 29:

VQCQQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV
IWYDGSHKY/LYA/TDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY SARDYY
DTSRHHWGFD CWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTS (SEQ ID NO:128)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5' CAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCTGGATCCAGTGAGGAAATTGT
 GATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATC
 TCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGAAGATGGAAACACCTATTTGG
 ACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATACGCTTTC
 CCATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGCACTGA
 TTTACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTGCTGC
 ATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATT
 AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
 TGAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
 GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC3' (SEQ ID NO:31)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 31:

QLLGLLMLWVPGSSEEIVMTQTPLSLPVTPEPAPISCRSSQSLLDSEDGNTYLDWY
LQKPGQSPQLLIYTLSHRASGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYCCMQR
VEFPIFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 N (SEQ ID NO:129)

5 mAb 2.59 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5' CAGTCGGGCCCAAGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCAC
 TGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGATGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAG
 CACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACC
 TTCTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTGCCATATCAGTGGACACGTCTAAGA
 ACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTA
 CTGTGCGAGAGAATCCCCTCATAGCAGCAACTGGTACTCGGGCTTTGACTGCTGG
 GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCT
 TCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
 GCCTGGTCAAGGACTACTTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGC
 GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
 CT3' (SEQ ID NO:33)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 33:

10 XXXXXQSGPRLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDGYYSWIRQHPGKGLEWIGYIYY
SGSTFYNPSLKSRVAISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARESPHSSNWYSGF
DCWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPRTGDGVVELRRP
DQRRAHLPGCPTVLRTL (SEQ ID NO:130)

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5'ACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCAC
CTGCCGGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGTAGGTTACACTGGTACCAGCAGAAACC
AGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAAGTATGCTTCCCAGTCCTTCTCAGGGGTC
CCCTCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCACCATCAATA
GCCTGGAAGCTGAAGATGCTGCAACGTATTACTGTCATCAGAGTAGTAATTTACC
ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACC
ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTC3' (SEQ ID NO:35)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 35:

XXXXTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASOSIGSRLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSF
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSNLPFTFGPGTKVDIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL (SEQ ID NO:131)

5 mAb 2.61 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGGCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGAAGCTATGGCATGCACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGAT
GGAAGTAATAAATACTATAACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATCACTGGG
GGTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAA
GGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGT
GGAATCAGGCGCCCTGACCAGGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC3' (SEQ ID
NO:37)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 37:

QVQLVE/QAGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLKVVAVI
WYDGSNKY/LYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDYYDN
SRHHWGF~~DY~~WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTRRRRAHLPG (SEQ ID NO:132)

10

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCGGTGTGCATCCGTAGGAGACAG
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATCAGAAATGATTTAGCTTGGTAT
 CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTG
 CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTAGATCTGGGACAGAATTCCT
 CTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGCTTATTACTGTCTCCAGC
 ATAATAGTTACCCTCCCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAA
 CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAAGTCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
 GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG3' (SEQ ID NO:39)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 39:

DIQMTQSPSSRCASVGDRTITCRASQGIRNDLAWYQQKPGKAPKRLIYAASSLO
SGVPSRFRSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFAAYYCLQHNSYPPSFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS (SEQ ID NO:133)

5 mAb 2.70 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5'CATGTGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCATCTTCAGTCGCTATGGCATG
 CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGAAATGGGTGGCAGTTATATGG
 TATGATGGAAGTAATAAACTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT
 CCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
 AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATTACTATGATAATAGTAGACATC
 ACTGGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTC
 CAGCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG
 AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGA3' (SEQ ID NO:41)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 41:

HVQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYGMHWVRQAPGKGLKWWAVI
WYDGSNKLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYDNS
RHHWGFQYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTY
SWNSGAL (SEQ ID NO:134)

10

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5'TCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCCCTGGATCAGTGAGGATATTGTG
 ATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCT
 CCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGA
 CTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACACGCTTTCC
 TATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTGAGGCACTGAT
 TTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGC
 ATGCAACGTGTAGAGTTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATT
 AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
 TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
 GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCT3' (SEQ ID NO:43)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por
 SEQ ID NO: 43:

SAPGAANALGPWISEDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSRSLDSDDGNTYLDWYL
QKPGQSPQLLIYTL~~SYRAS~~GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQRV
EFPIFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 A (SEQ ID NO:135)

5 mAb 2.70.2 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5'CGGCCGCCTATTTACCCAGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGTGTGTAGTGGTTGT
 GCAGAGCCTCATGCATCACGGAGCATGAGAAGACATTCCTCCTGCCACCTGCT
 CTTGTCCACGGTTAGCCTGCTGTAGAGGAAGAAGGAGCCGTCGGAGTCCAGCAC
 GGGAGGCGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCCGGCTGCCATTGCTCTCCACTCCACG
 GCGATGTCGCTGGGGTAGAAGCCTTTGACCAGGCAGGTCAGGCTGACCTGGTTC
 TTGGTCATCTCCTCCTGGGATGGGGGCAGGGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCT
 GCCCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTTCTCGATGGAGGACGGGAGGCCTTTGTTGGA
 GACCTTGCACTTGTACTCCTTGCCGTTTCAGCCAGTCCTGGTGCAGGACGGTGAGG
 ACGCTGACCACACGGTACGTGCTGTTGAACTGCTCCTCCCAGGGCTTTGTCTTGG
 CATTATGCACCTCCACGCCATCCACGTACCAGTTGAACTGGACCTCGGGGTCTTC
 CTGGCTCACGTCCACCACCACGCACGTGACCTCAGGGGTCCGGGAGATCATGAG
 AGTGTCCCTGGGTTTTGGGGGAACAGGAAGACTGATGGTCCCCCAGGAACTC
 AGGTGCTGGGCATGATGGGCATGGGGGACCATATTTGGACTCAACTCTCTTGTC
 ACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTGATCTACGTTGCAGGTGTAGGTCTTCGTGCCCA
 AGCTGCTGGAGGGCACGGTCACCACGCTGCTGAGGGAGTAGAGTCTGAGGACT
 GTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
 ACACCGTACCCGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAGCCAGGGCGGCTG
 TGCTCTCGGAGGTGCTCCTGGAGCAGGGCGCCAGGGGGAAGACGGATGGGCCCT
 TGGTGGAAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGTAGTCAAACC
 CCCAGTGATGTCTACTATTATCATAGTAATCTCTCGCACAGTAATACACAGCCGT
 GTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGCGTGTCTTGGAAATTGTCTC
 TGGAGATGGTGAATCGGCCCTTCACGGAGTCTGCATAGAGTTTATTACTTCCATC
 ATACCATATAACTGCCACCCATTTACGCCCTTGCTGGAGCCTGGCGGACCCAG
 TGCATGCCATAGCGACTGAAGATGAATCCAGACGCTGCACAGGAGAGTCTCAGG
 GACCTCCCAGGCTGGACCACGCCTCCCCAGACTCCACCAGCTGCACCTGACACT
 GGACACCTTTTAAAATAGCCACAAGAAAAGCCAGCTCAGCCCAAACCTCCATGG
 TGGTCGACT3' (SEQ ID NO:136)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 136:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSRYGMHWV
RQAPGKGLKWWAVIWDGSENKLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCARDYYDNSRHHWGFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
GK (SEQ ID NO:137)

5 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5' AGTCGACCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGC
TCCCAGATAACCACCGGAGATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGT
CACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGGAGCCTCTTGAT
AGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCT
CCACAGCTCCTGATCTACACGCTTTCCTATCGGGCCTCTGGAGTCCCAGACAGGT
TCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGG
CTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATGCAACGTGTAGAGTTTCTATCACCTT
CGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGCGGCCG3' (SEQ ID NO:138)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante de SEQ ID NO: 138:

METPAQLLFLLLLWLPDITGDIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSRSLDSDDGNTY
LDWYLQKPGQSPQLLIYTLNRAAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY
CMQRFEPITFGQGRLEIKRTVAAPSVPFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC (SEQ ID NO:139)

10 mAb 2.76 anti-TIM-1

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante:

5'GAGCAGTCGGGGGGCGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGTACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGCAATAAA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGGGATTTCTATGATAGTAGTCGTTACCACTACGGTATGGACGTCT
GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCG
TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAG
CGCCTGACCAGCGGCGTGCAACACTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TCT3' (SEQ ID NO:45)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 45:

XXXXEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVIWIY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARDFYDSSRYH
YGMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLS (SEQ ID NO:140)

5 Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante:

5'ACTCAGTGTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCC
TGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGATAGTGATGATGGAACACCTATTTGGACT
GGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATACGGTTTCCTA
TCGGGCCTCTGGAGTCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTT
CACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCATG
CAACGTATAGAGTTTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACCCGACTGGAGATTAAA
CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAA3' (SEQ ID NO:47)

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana y una porción de región constante codificada por SEQ ID NO: 47:

XXXXTQCPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYT
VSYRASGVDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFPITFGQGRLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN (SEQ ID NO:141)

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humano aislado o un fragmento de enlazamiento del mismo que se enlaza específicamente a células T, dominio de inmunoglobulina y dominio 1 de mucina (TIM-1), en donde dicho anticuerpo o fragmento de enlazamiento tiene un polipéptido de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y un polipéptido de cadena liviana que comprende tres CDRs, en donde las tres cadenas pesadas CDRs y las tres cadena liviana CDRS se seleccionan de:
- 10 (a) un CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos GFIFSRYGMH, un CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos VIWYDGSNKLYADSVK, una cadena CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos DYYDNSRHHWGFYD, una cadena CDR1 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos RSSRLLDSDDGNTYLD, una cadena CDR2 de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos TLYRAS, y una cadena CDR3 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos MQRVEFPIT; y
- 15 (b) una cadena CDR1 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSISSDGYYS, una cadena CDR2 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos YIYSGSTFYNPSLKS, una cadena CDR3 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ESPHSSNWYSGFDC, una cadena CDR1 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSIGSRLH, una cadena CDR2 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos YASQSFS, y una cadena CDR3 liviana que comprende la secuencia de aminoácidos HQSSNLPFT.
- 20 2. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1, en donde dicho TIM-1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 54.
- 30 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo de cadena sencilla.
4. El fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento de enlazamiento comprende un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv de un anticuerpo humano.
- 25 5. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1 (a), en donde dicho anticuerpo o fragmento de enlazamiento tiene un polipéptido de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 137 y un polipéptido de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 139.
6. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1 (b), en donde dicho anticuerpo o fragmento de enlazamiento tiene una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 130 y un polipéptido de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 131.
- 30 7. Un anticuerpo o fragmento de enlazamiento que enlaza al mismo epítipo de TIM-1 como el anticuerpo de la reivindicación 1 (a), en donde dicho epítipo de TIM-1 es PLPRNHE (SEQ ID NO: 96) y/o el epítipo mínimo LPRQNH (SEQ ID NO: 97).
8. El anticuerpo, o fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de enlazamiento está asociado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 35 9. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de enlazamiento está conjugado a un agente terapéutico, opcionalmente en donde el agente terapéutico es una toxina, o un isótopo radioactivo, o un agente quimioterapéutico.
- 40 10. Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1.
11. Una célula transformada que comprende un gen que codifica el anticuerpo o fragmento de enlazamiento de la reivindicación 1.
12. La célula transformada de la reivindicación 11, en donde la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 45 13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de enlazamiento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en mezcla con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
14. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en una medicina.

15. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método para tratar una enfermedad neoplásica.
16. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento para uso de acuerdo con la reivindicación 15 en donde dicha enfermedad neoplásica es cáncer o tumor.
- 5 17. El anticuerpo o fragmento de enlazamiento para uso de acuerdo con la reivindicación 16 en donde dicho cáncer es cáncer renal.
18. Un artículo de manufactura que comprende un contenedor, una composición contenida en el mismo, y un inserto de empaque o etiqueta que indica que la composición puede ser usada para tratar cáncer renal o cáncer de ovario caracterizado por la sobreexpresión de TIM-1, en donde la composición comprende un anticuerpo humano o fragmento de enlazamiento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10 19. Un kit de ensayo para la detección de TIM-1 en tejidos o células de mamífero con el fin de cribar carcinoma renales, siendo el TIM-1 un antígeno expresado por carcinomas renales, comprendiendo el kit un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y medios para indicar la reacción del anticuerpo con el antígeno, si está presente.
- 15 20. El kit de ensayo de la reivindicación 19, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, opcionalmente, en donde el anticuerpo que se enlaza al antígeno está marcado.
21. El kit de ensayo de la reivindicación 19, en donde el anticuerpo es un primer anticuerpo no etiquetado y los medios para indicar la reacción comprende un segundo anticuerpo etiquetado que es antiinmunoglobulina.
- 20 22. El kit de ensayo de la reivindicación 20, en donde el anticuerpo que se enlaza al antígeno está marcado con un marcador seleccionado del grupo consistente de un fluorocromo, una enzima, un radionúclido y un material radioopaco.
23. El kit de ensayo de la reivindicación 21, donde el segundo anticuerpo está marcado con un marcador seleccionado del grupo consistente de un fluorocromo, una enzima, un radionúclido y un material radioopaco.

Figura 1

Ensayo ELISA de anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 1.29, 2.56.2, 2.59.2, y 2.45.1 en contra del antígeno TIM-1

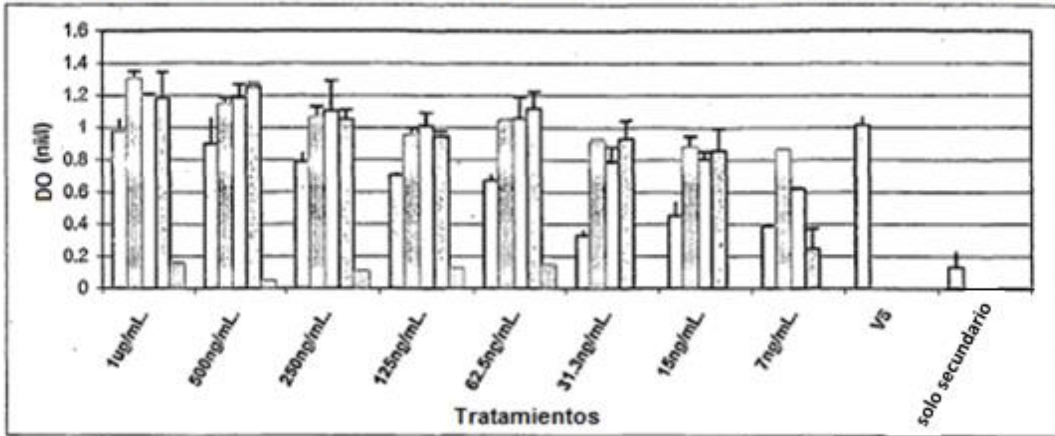


Figura 2

Ensayo ELISA de anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 1.29, 2.56.2, 2.59.2, y 2.45.1 en contra de proteína irrelevante

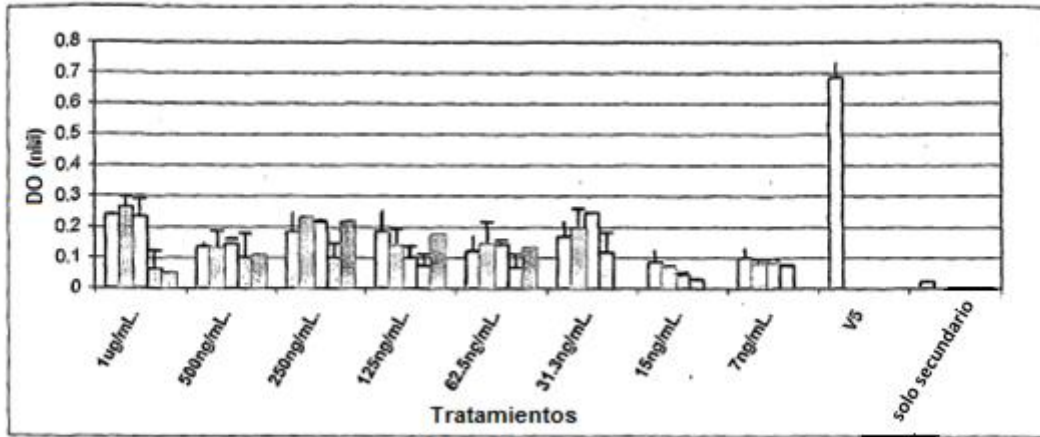


Figura 3A

Cáncer de Células Renales



Figura 3B

Cáncer Pancreático

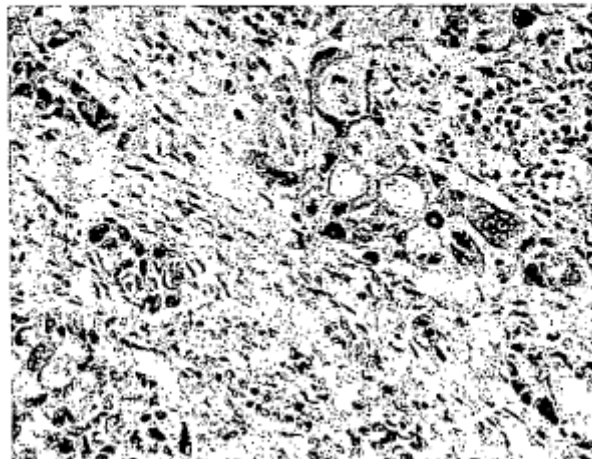


Figura 4

Resultados del ensayo clonogénico de muerte de la toxina mediada por anticuerpos monoclonales anti- TIM-1 en la línea celular ACHN de cáncer renal

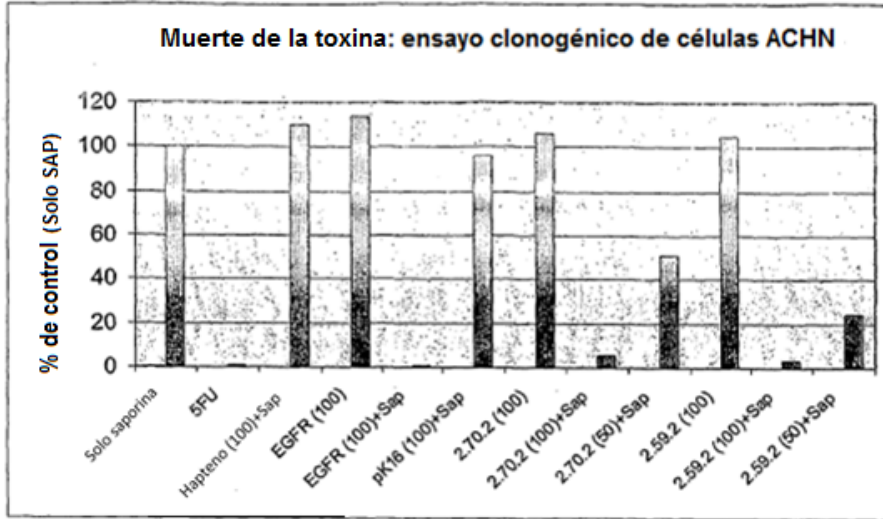


Figura 5

Resultados del ensayo clonogénico de muerte de la toxina mediada por anticuerpos monoclonales anti-TIM-1 en la línea celular BT549 del cáncer de mama

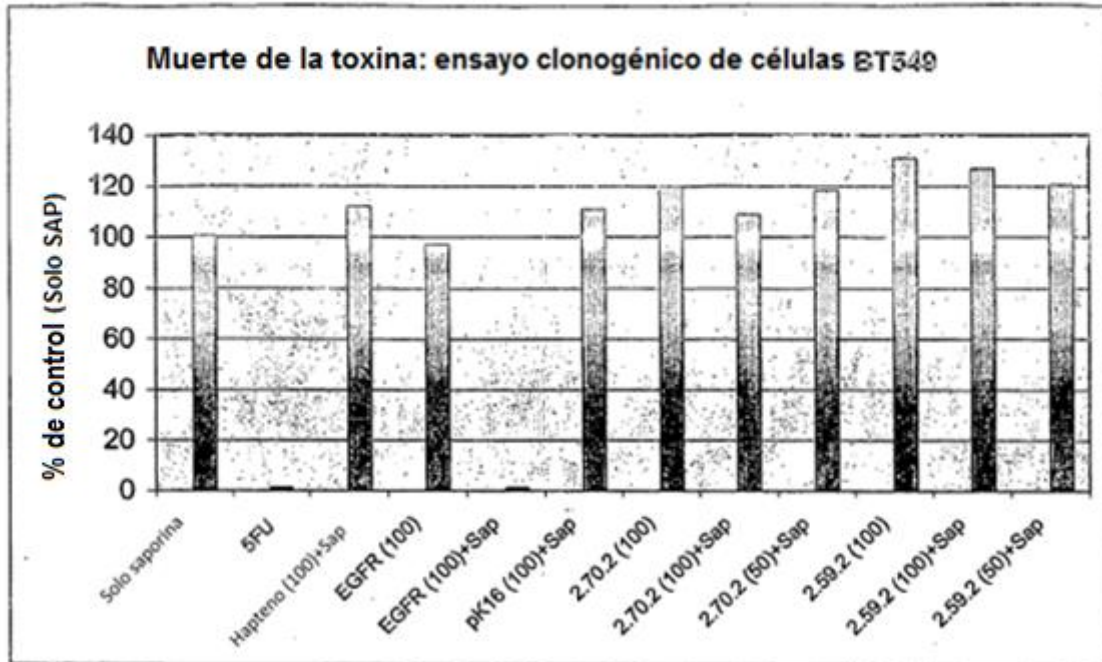


Figura 6

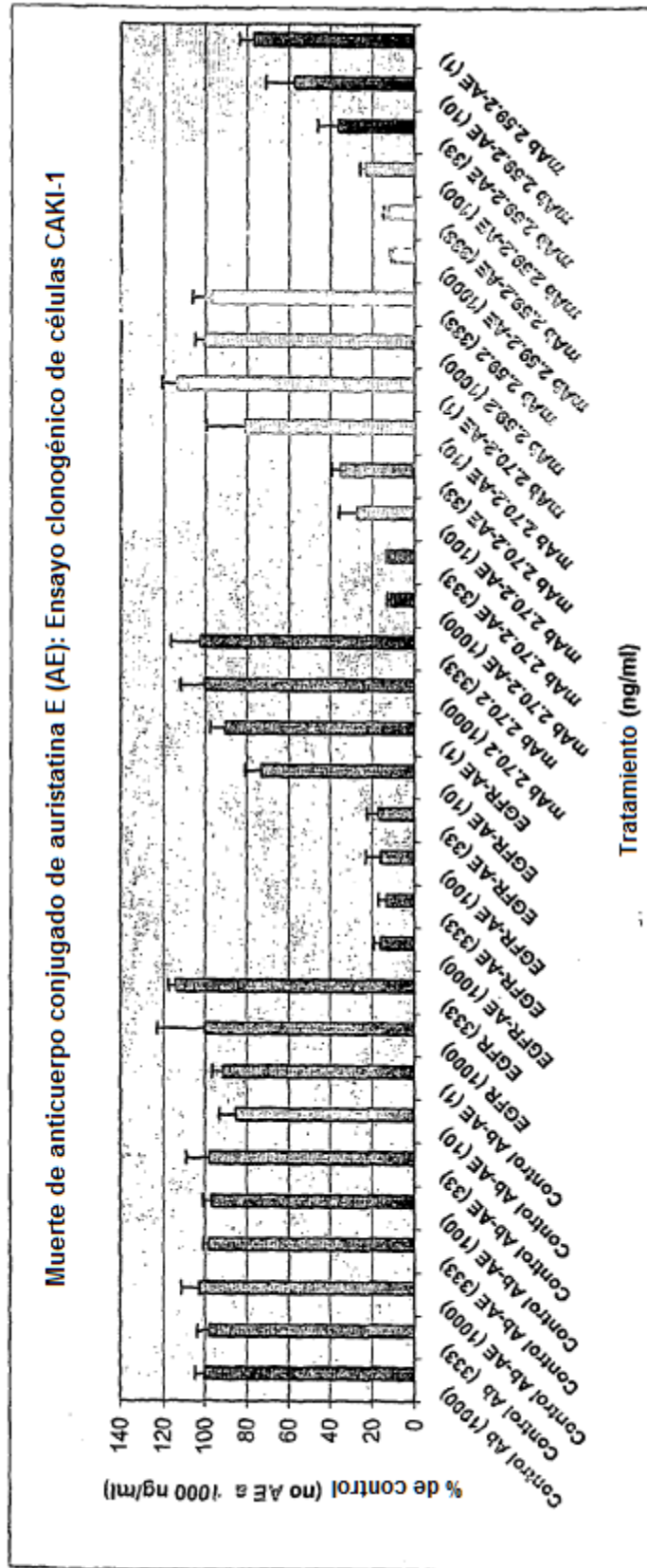


Figura 7

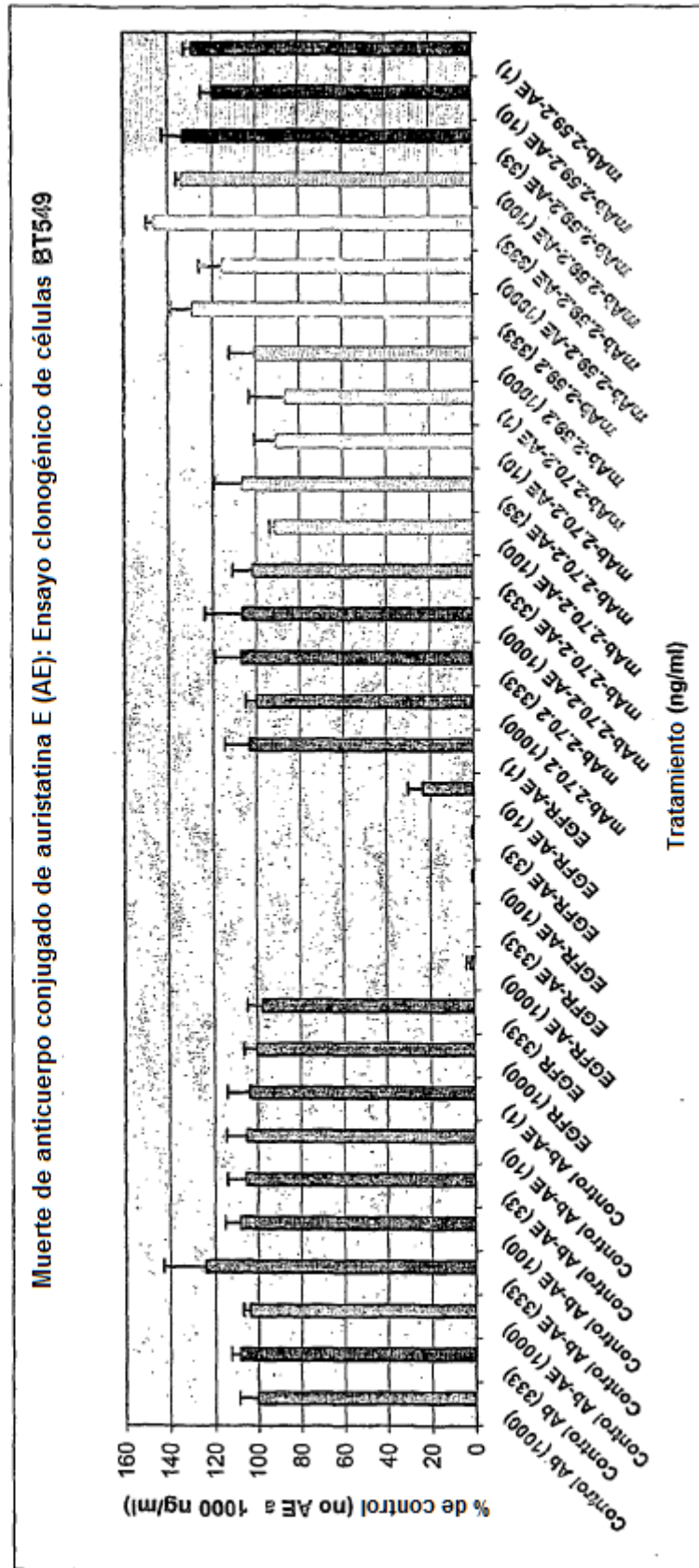


Figura 8

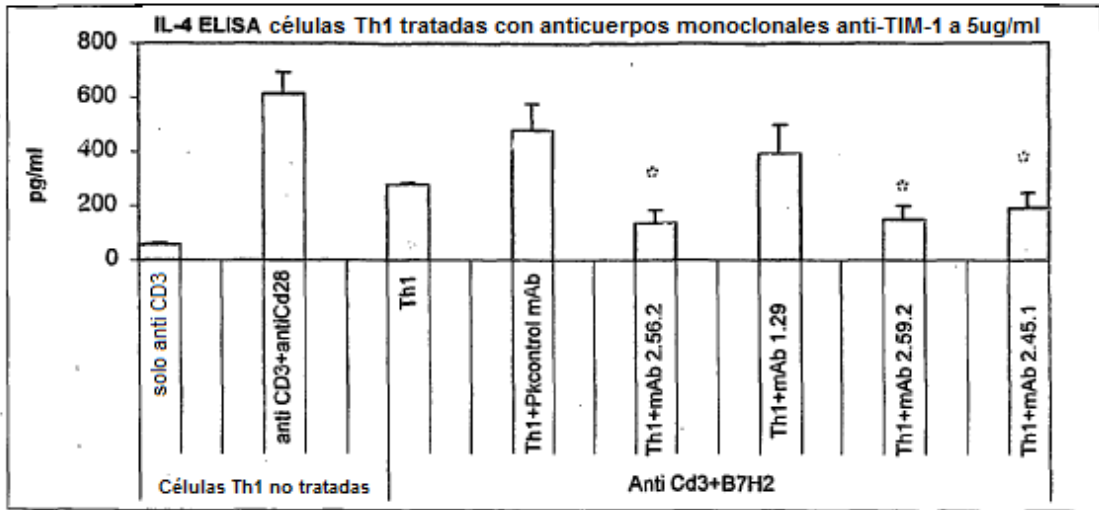


Figura 9

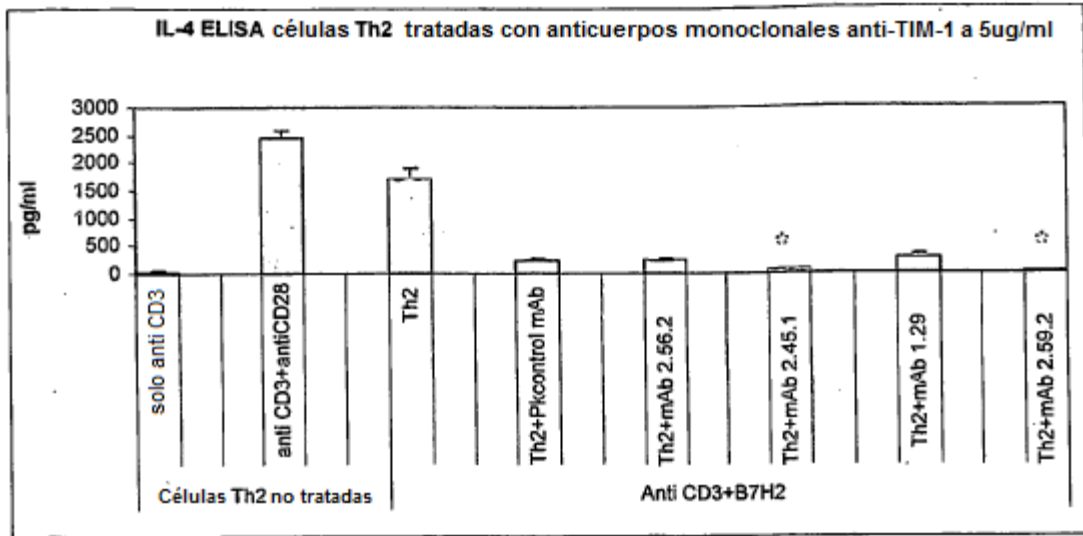


Figura 10

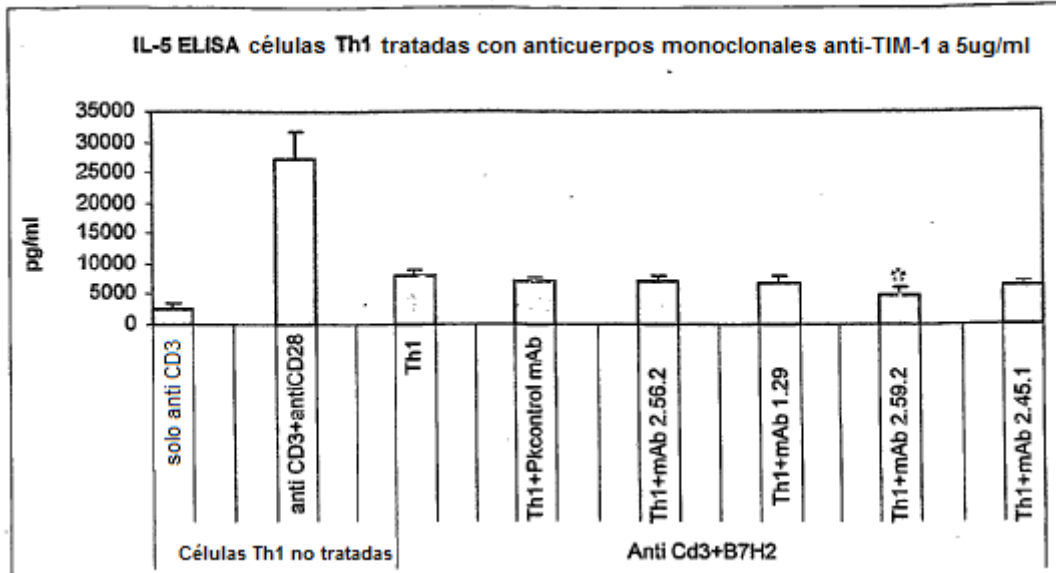


Figura 11

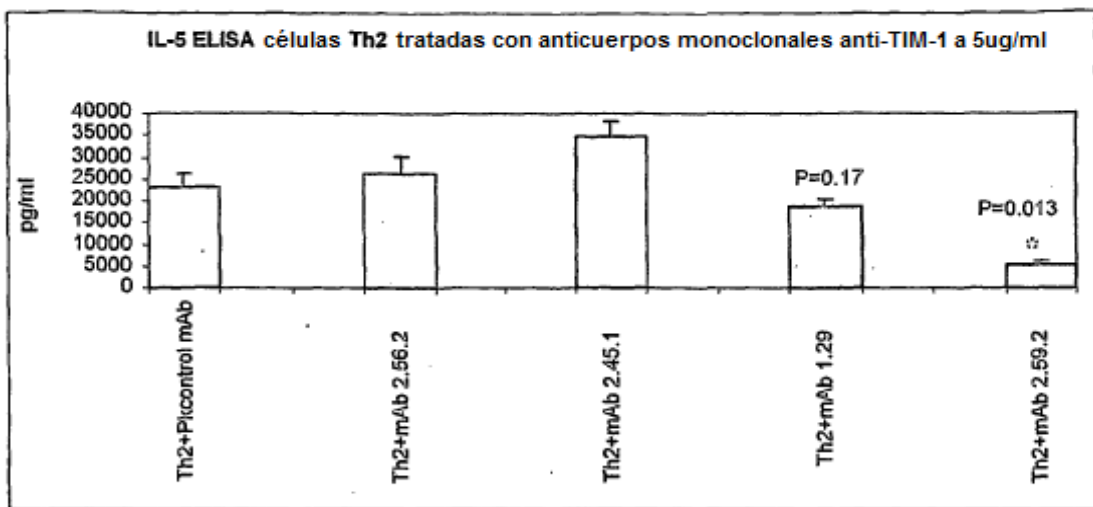


Figura 12

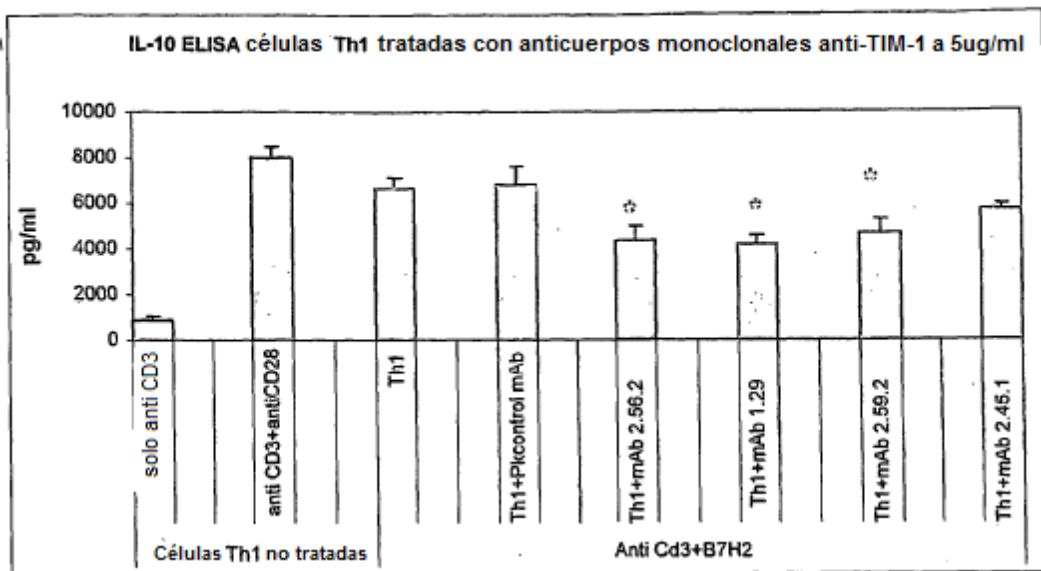


Figura 13

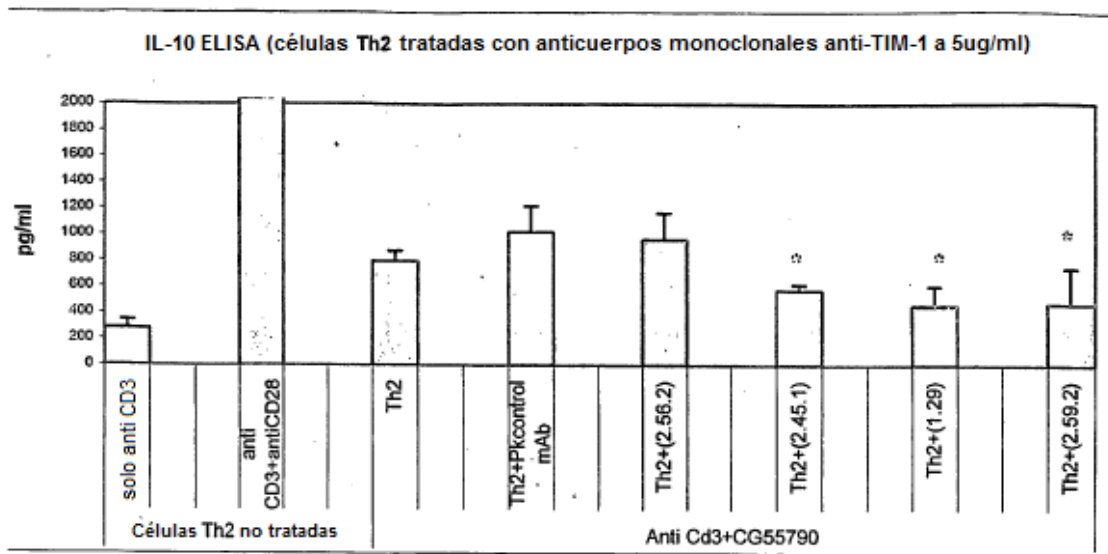


Figura 14

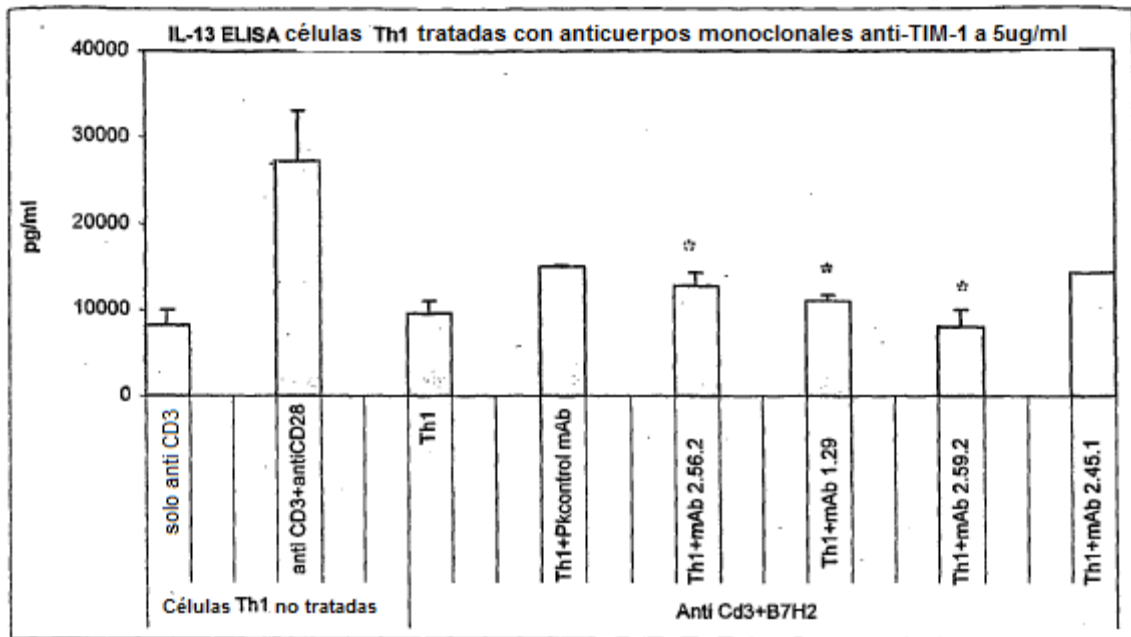


Figura 15

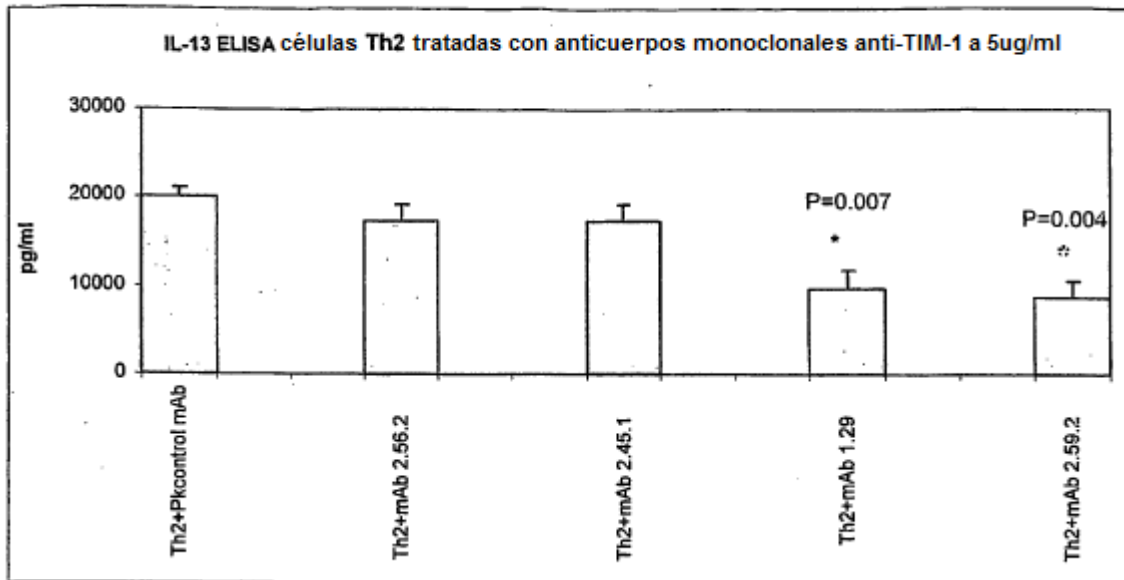


Figura 16

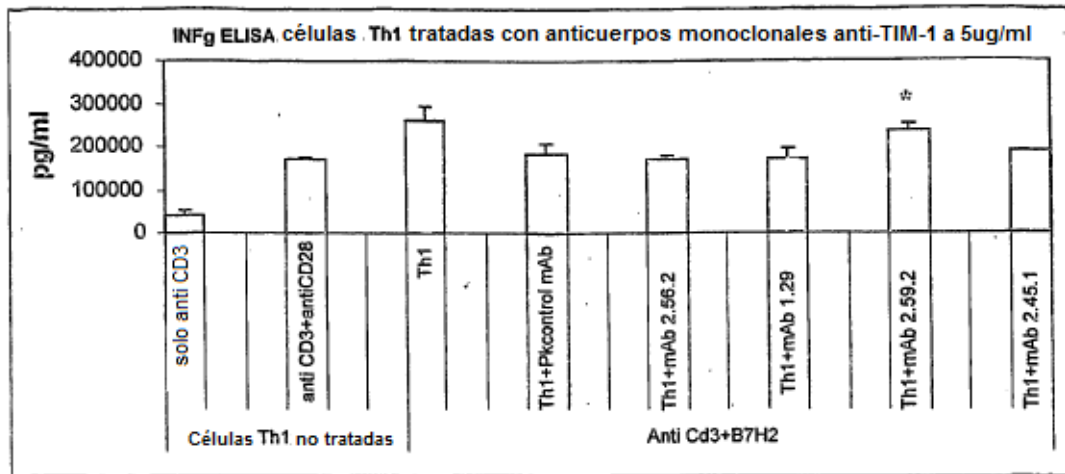


Figura 17

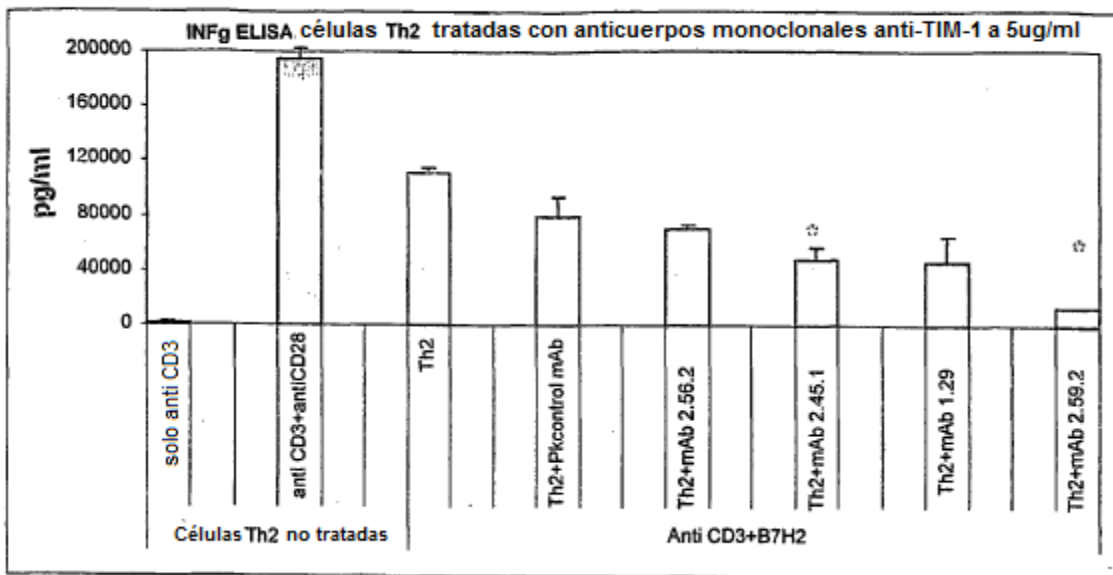


Figura 18A

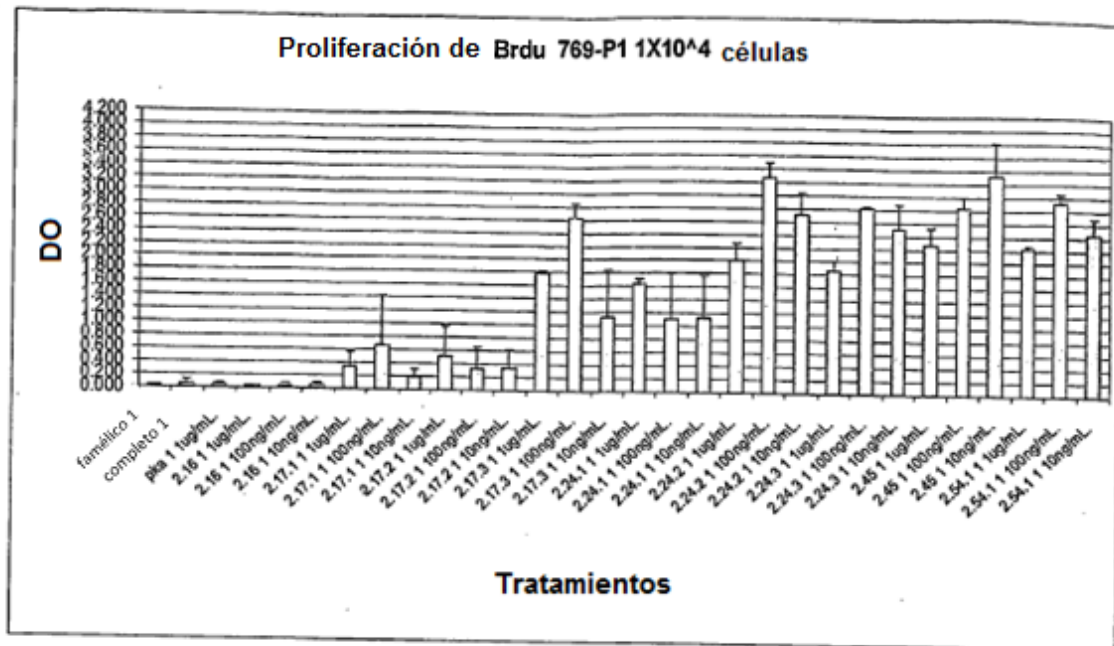


Figura 18B

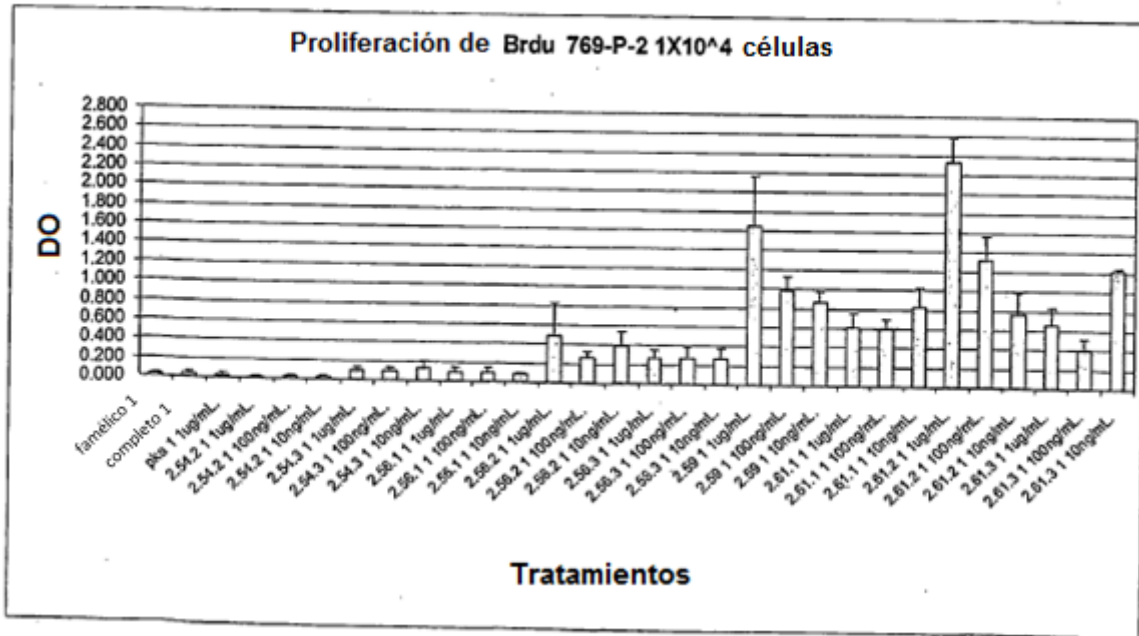


Figura 18C

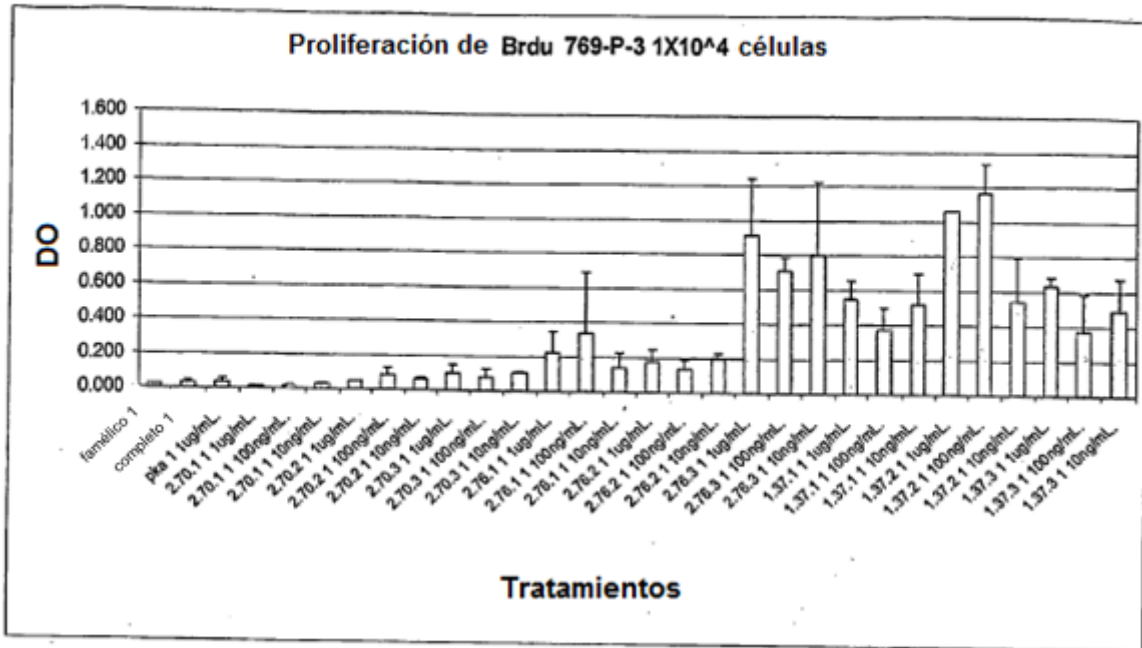


Figura 18D

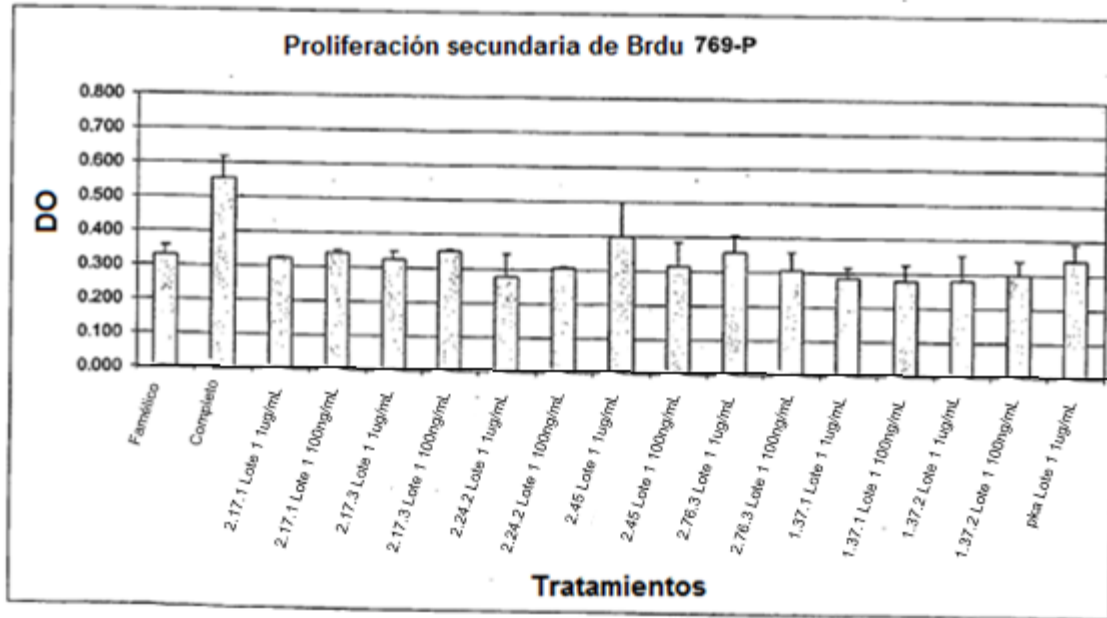


Figura 18E

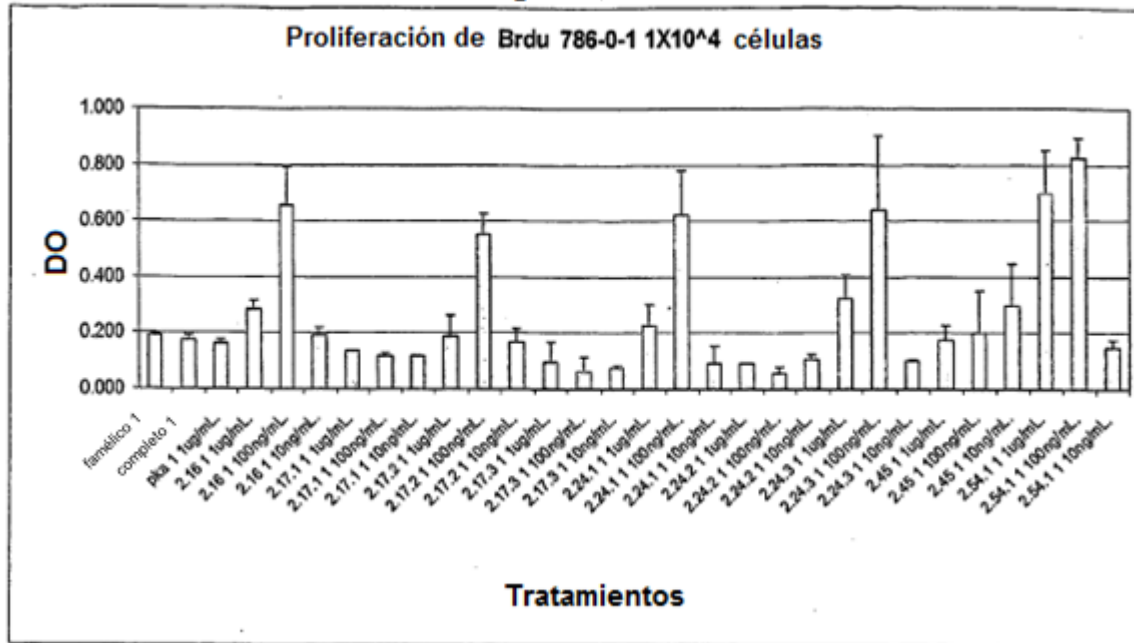


Figura 18F

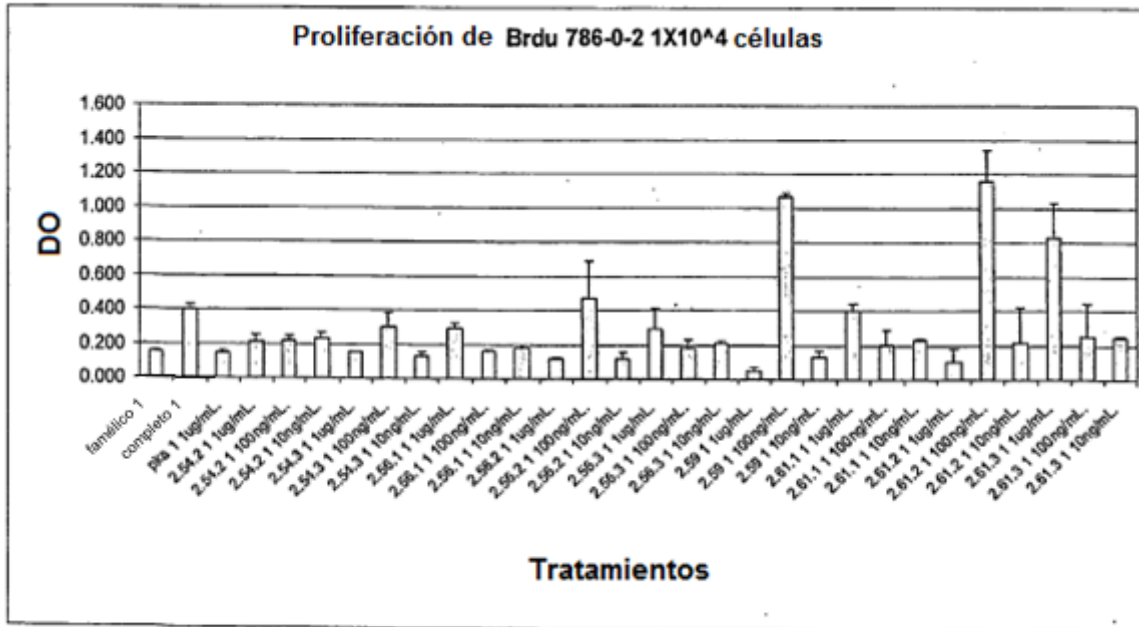


Figura 18G

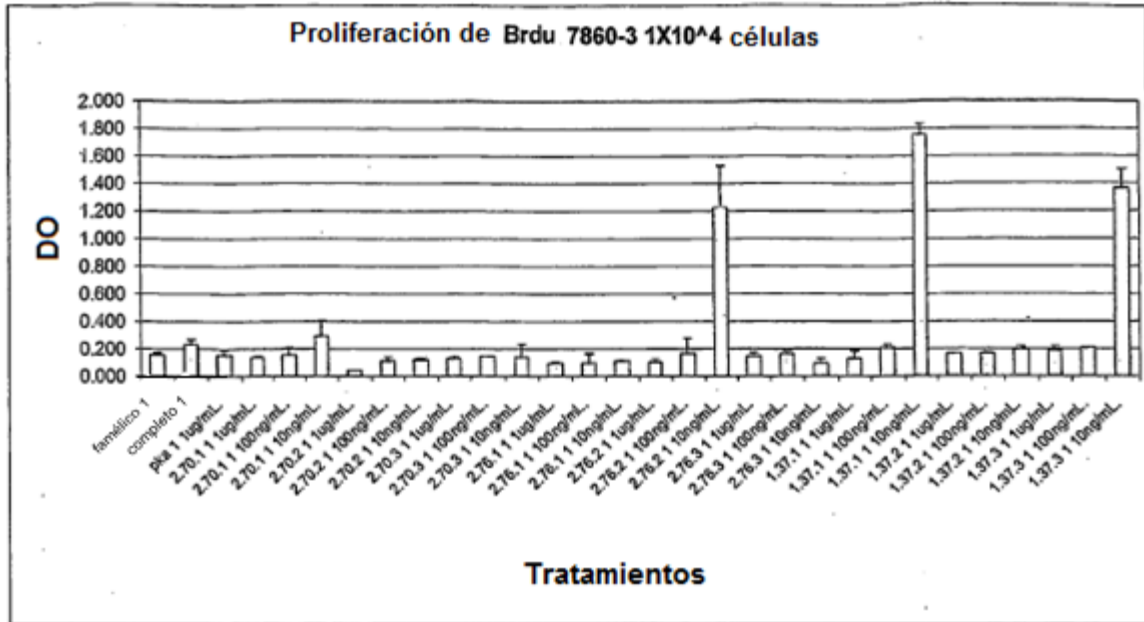


Figura 18H

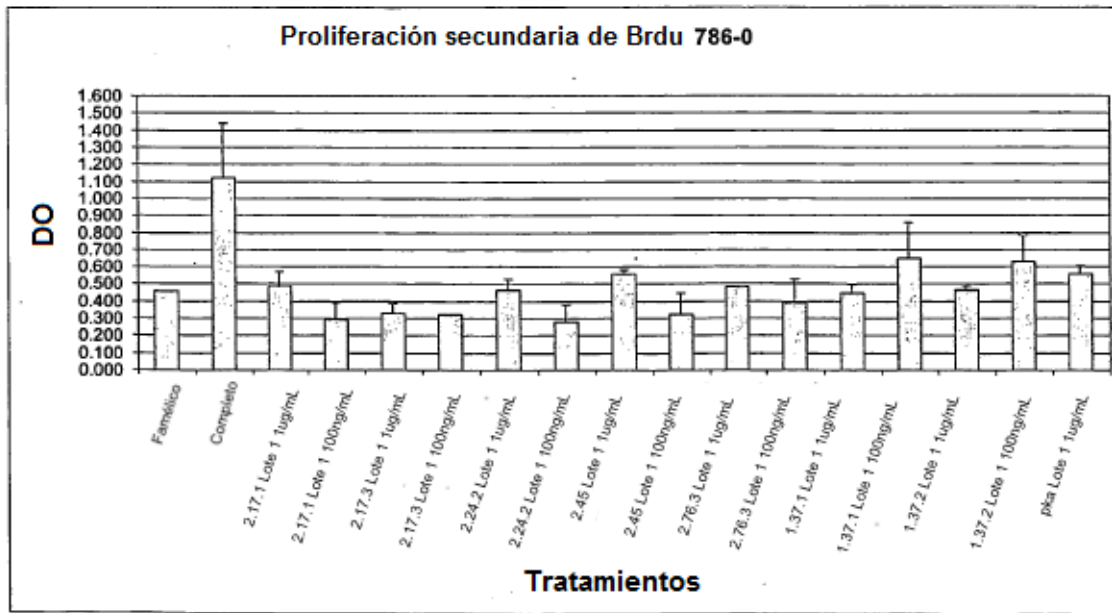


Figura 18I

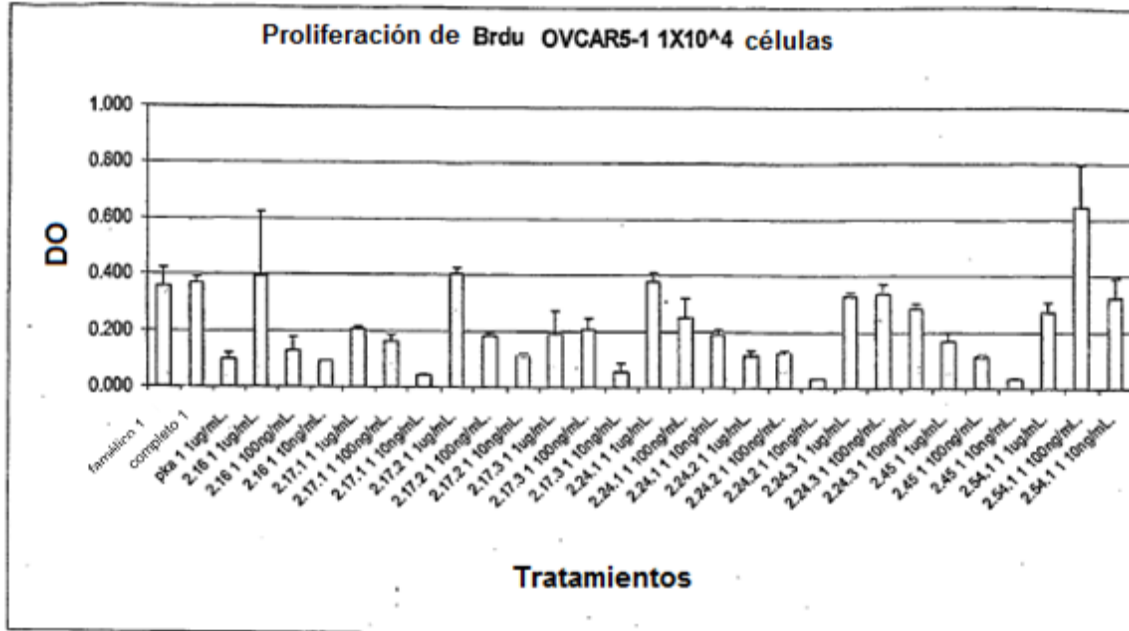


Figura 18J

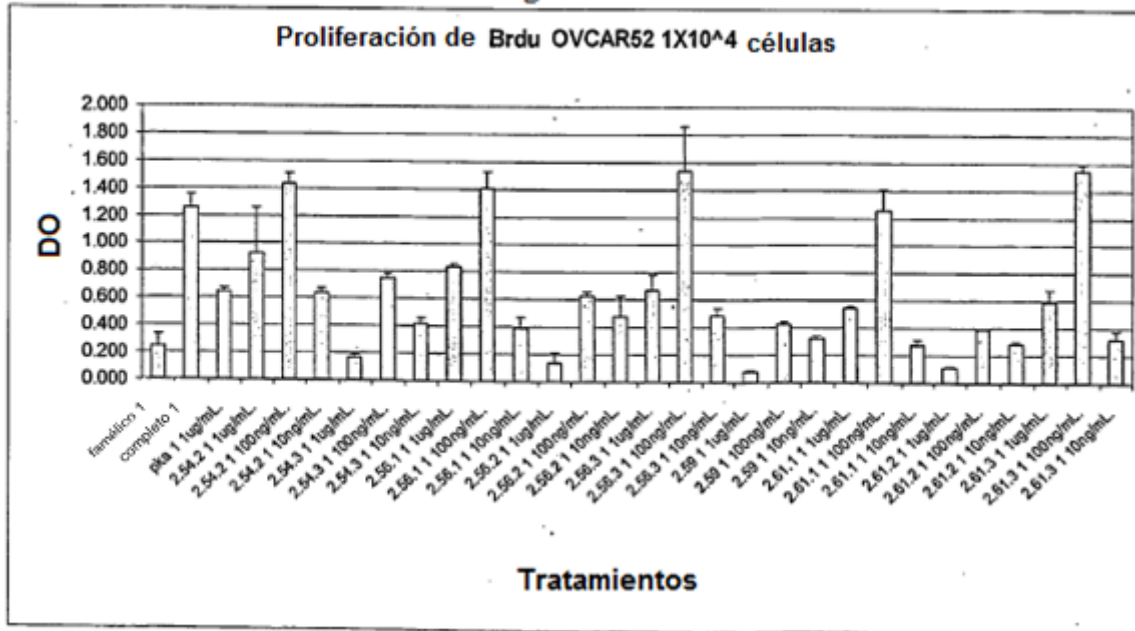


Figura 18K

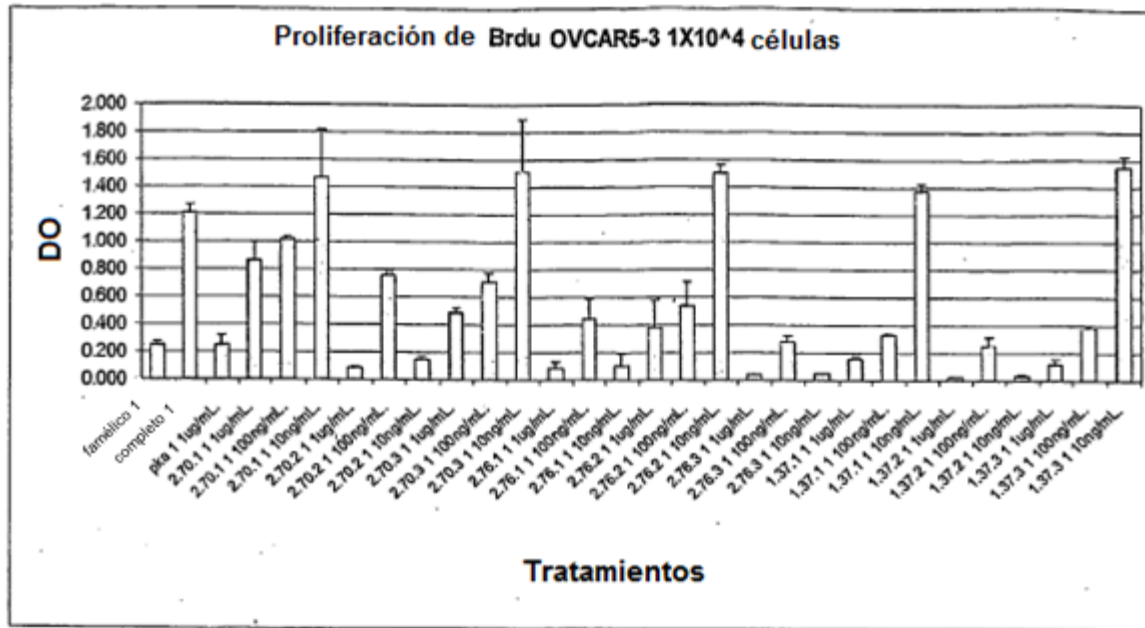
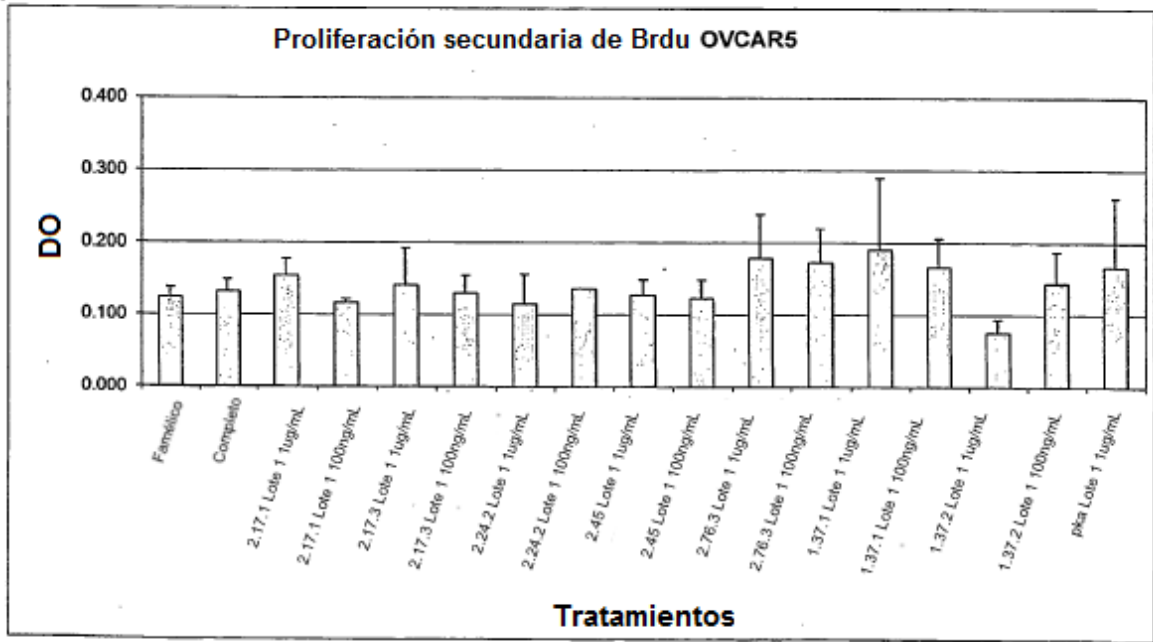
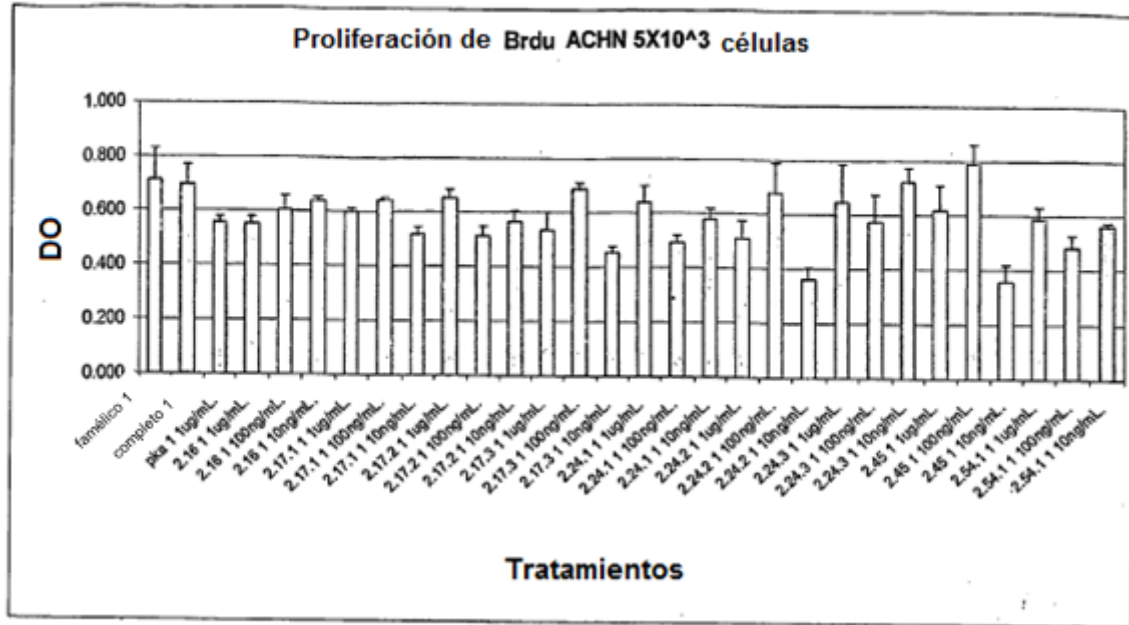


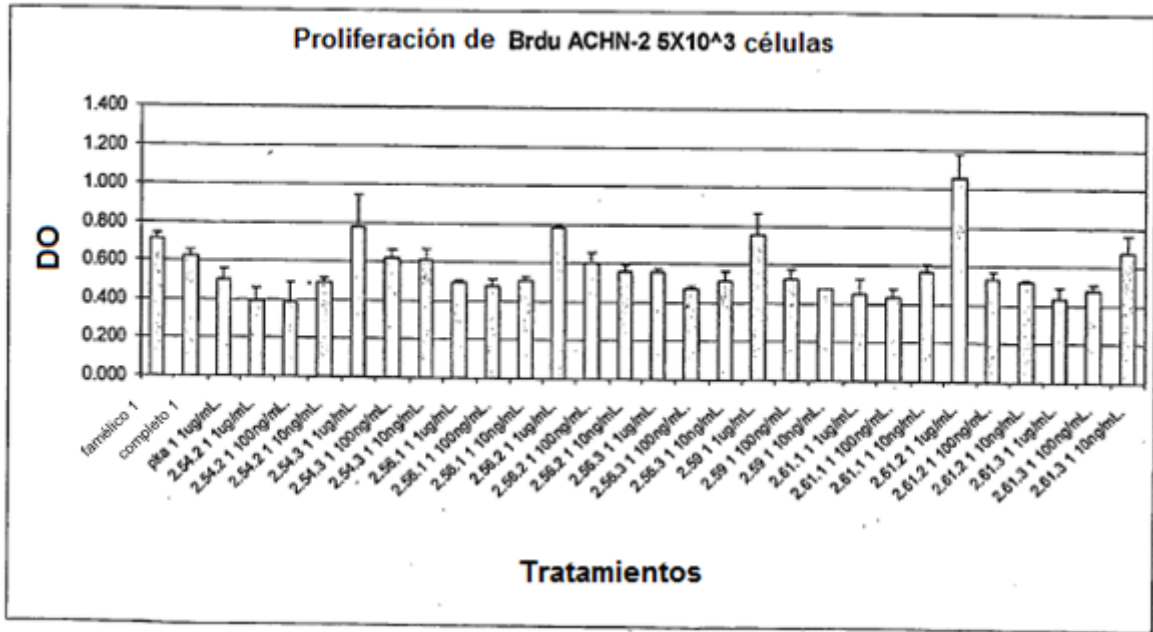
Figura 18L



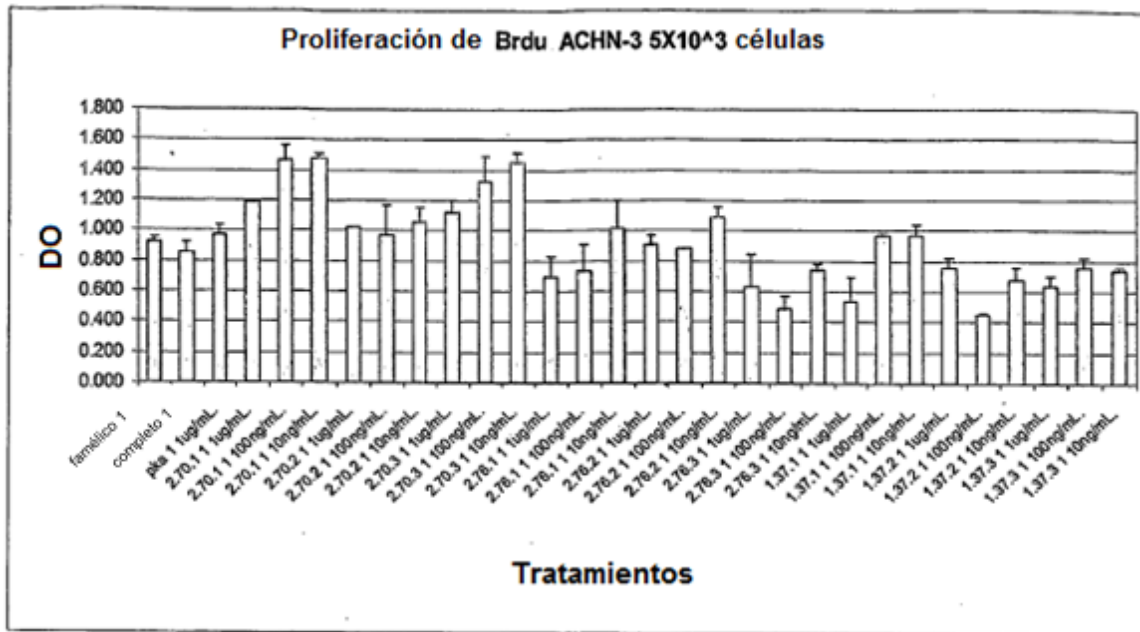
18M



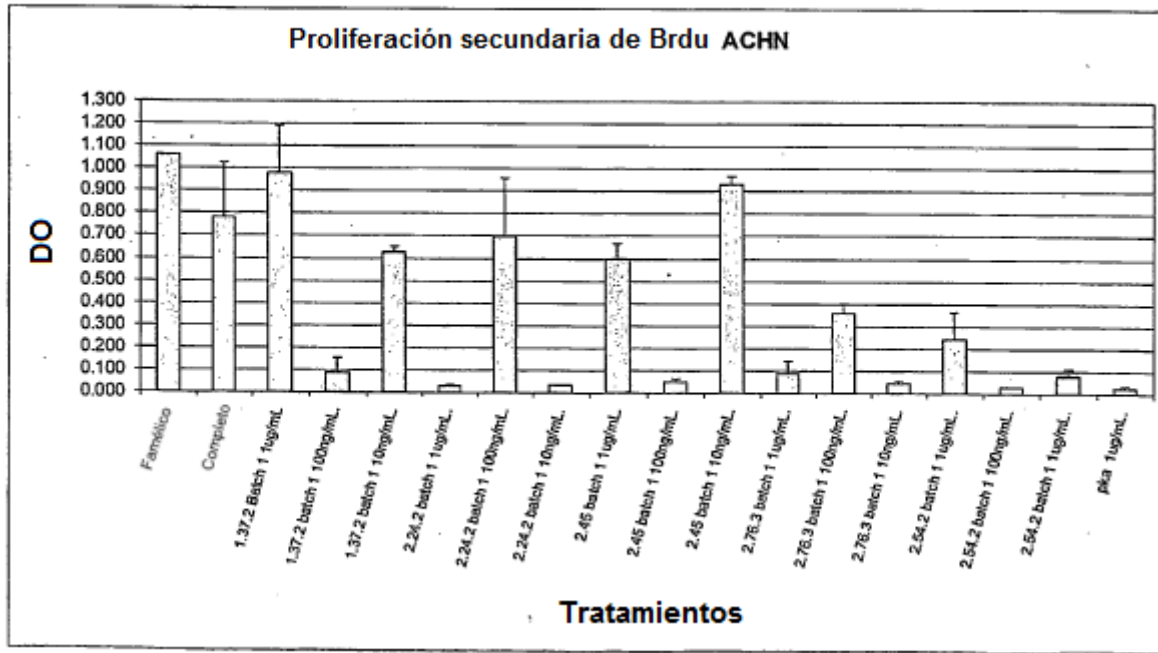
18N



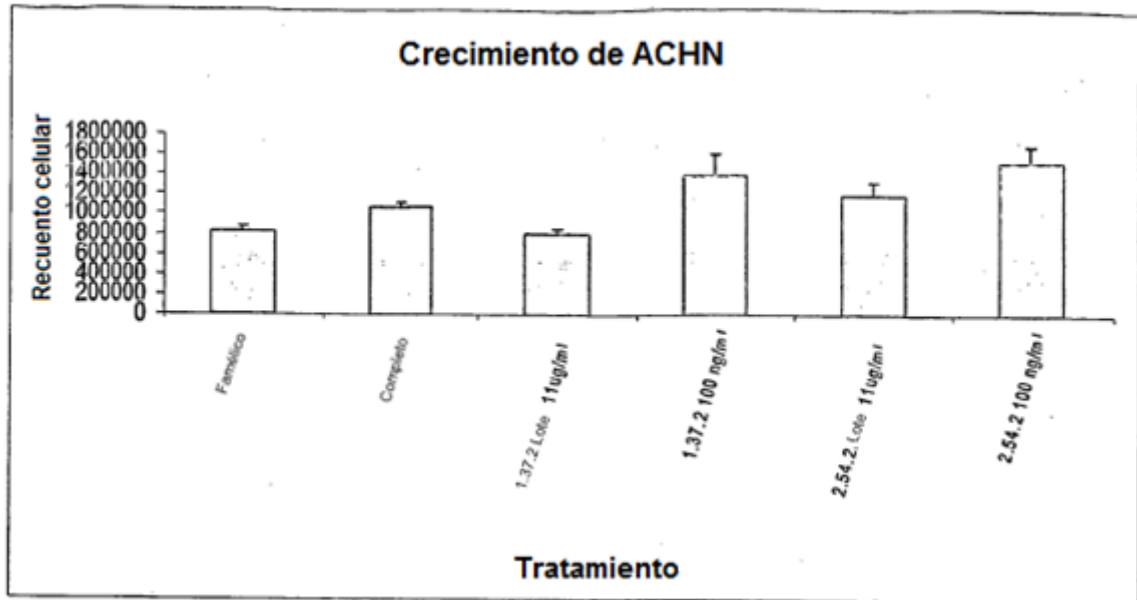
180



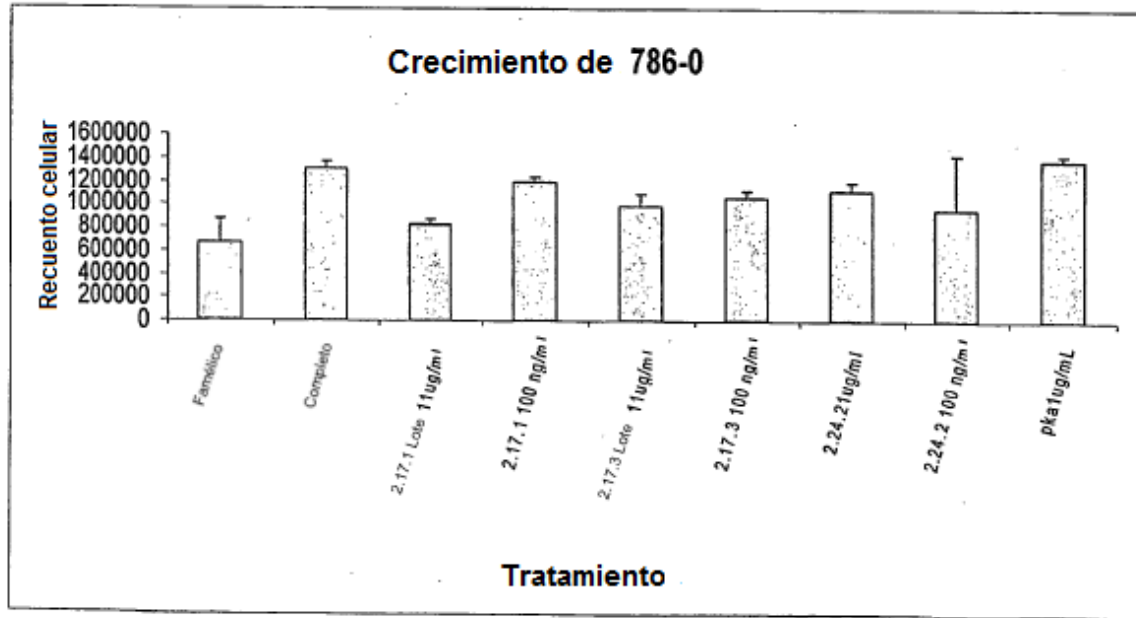
18P



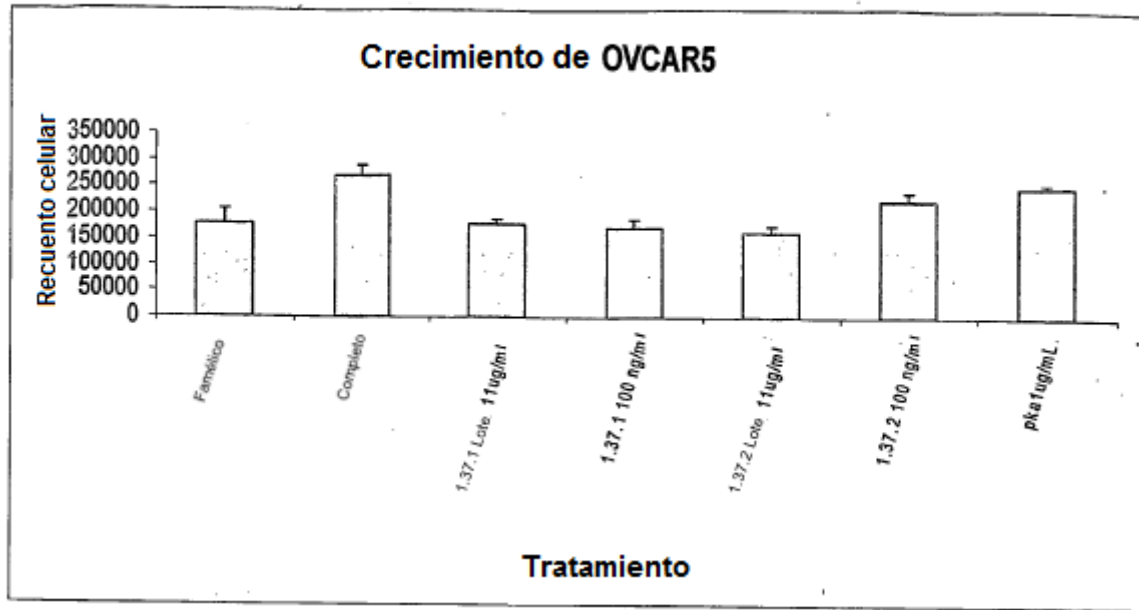
18Q



18R



18S



18T

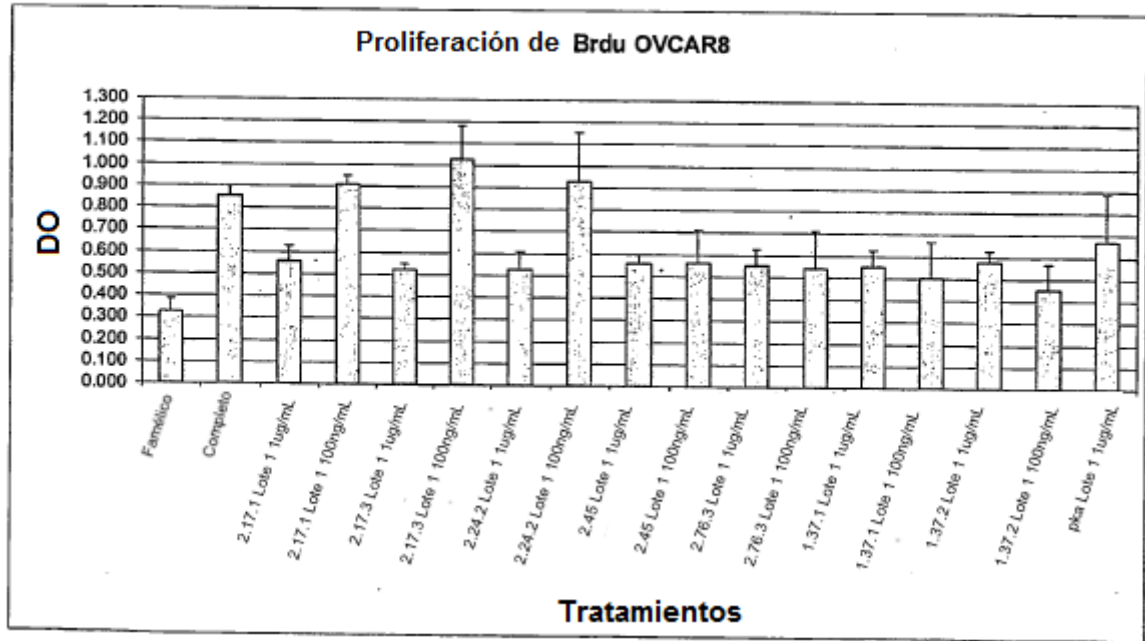


Figura 19A

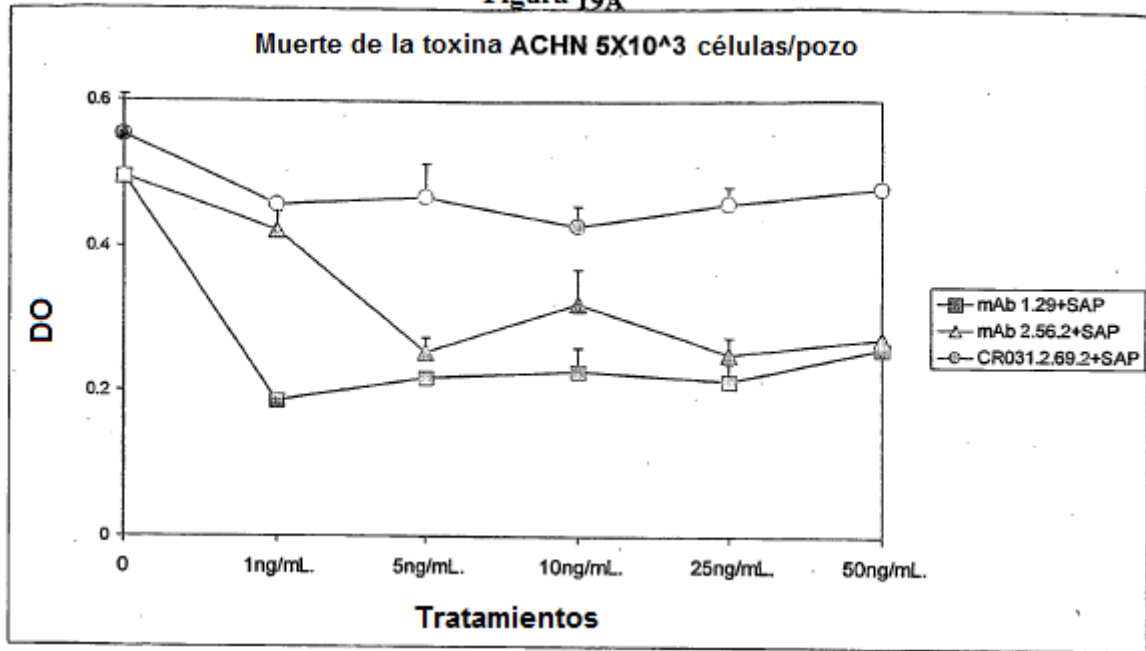


Figura 19B

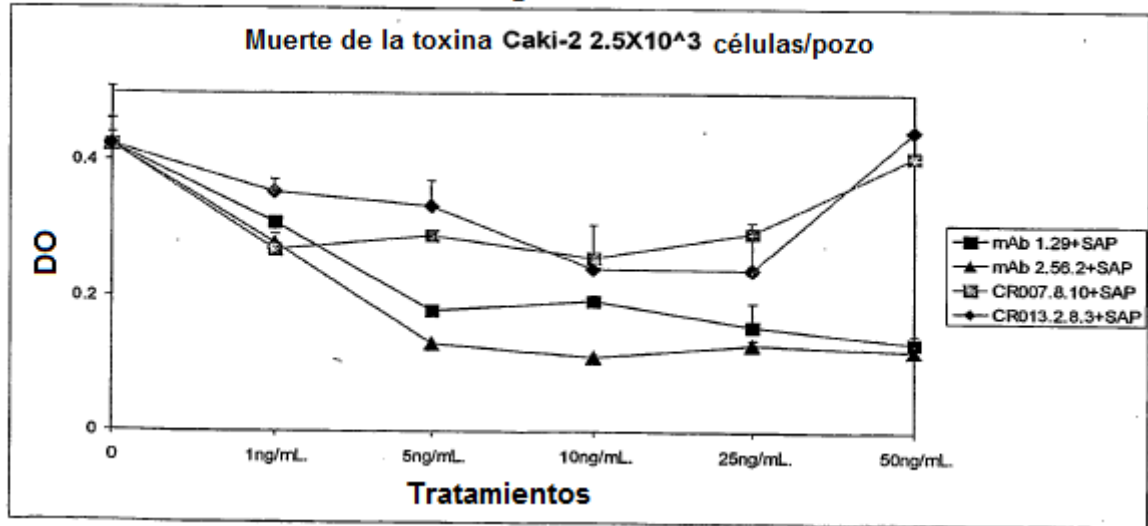


Figura 19C

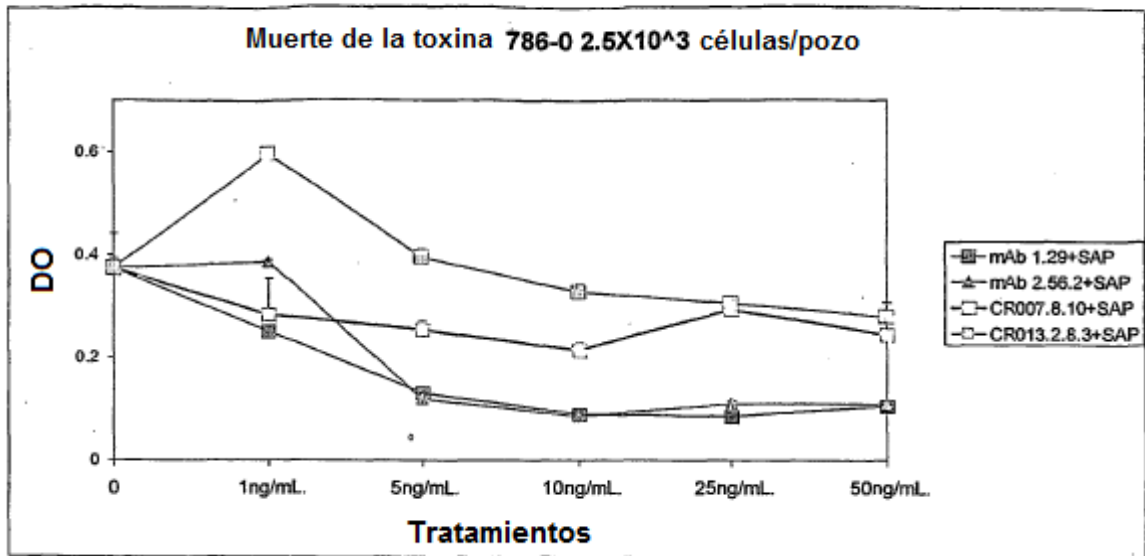


Figura 19D

