

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 194**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2012 PCT/IB2012/051304**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12131527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2012 E 12711279 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2694111**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo-fármaco**

30 Prioridad:

**01.04.2011 US 201161470576 P**

**01.02.2012 US 201261593549 P**

**23.02.2012 US 201261602349 P**

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

**05.01.2017**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)**

**235 East 42nd Street**

**New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**GERBER, HANS-PETER;**

**DIJOSEPH, JOHN FRANCIS;**

**KHANDKE, KIRAN MANOHAR;**

**MARQUETTE, KIMBERLY ANN;**

**SAPRA, PUJA y**

**TCHISTIAKOVA, LIUDMILA GENNADIEVNA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 596 194 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**

Conjugados de anticuerpo-fármaco

**Campo**

5 La presente divulgación se refiere en líneas generales a conjugados de anticuerpo anti-5T4-fármaco para el tratamiento del cáncer.

**Antecedentes**

10 Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), combinan la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales con la potencia de los agentes quimioterapéuticos. La tecnología asociada con el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra moléculas diana asociadas a tumor, el uso de agentes citotóxicos más eficaces y el diseño de enlazadores químicos para unir covalentemente estos compuestos, ha progresado rápidamente en los últimos años (Ducry L., y col. Bioconjugate Chemistry, 21:5-13, 2010).

15 Actualmente están en ensayo clínico ADC prometedores tales como SGN-75 (documento US2009/148942) y trastuzumab-DM1 (documento US2009/0226465). Sin embargo, según se consideran otros antígenos asociados a tumor para dianas, siguen existiendo numerosos retos. Cada anticuerpo monoclonal debe caracterizarse por separado, diseñarse un enlazador apropiado e identificarse un agente citotóxico adecuado que retenga su potencia tras el suministro a células tumorales. Se debe considerar la densidad del antígeno sobre la diana cancerosa y si los tejidos normales expresan el antígeno diana. Otras consideraciones incluyen si el ADC completo se internaliza tras la unión a la diana; si es preferible un fármaco citostático o citotóxico cuando se considera una posible exposición a tejido normal y/o el tipo y fase del cáncer que se está tratando y, si la el enlazador que conecta el anticuerpo a la carga de fármaco es un enlace escindible o no escindible. Además, la relación de conjugación del anticuerpo al resto de fármaco debe ser suficiente sin comprometer la actividad de unión del anticuerpo y/o la potencia del fármaco. Es evidente que los ADC son agentes biológicos complejos y los retos para desarrollar un ADC eficaz siguen siendo significativos.

25 El antígeno asociado a tumor 5T4 humano es el antígeno diana de la presente invención. Se ha demostrado recientemente que el antígeno 5T4 se expresa en altos niveles en ciertas células altamente tumorigénicas, también llamadas células iniciadoras de tumores (documento WO2010/111659). Las células iniciadoras de tumores muestran resistencia a terapias convencionales y se cree que son responsables de la recidiva de los tumores y la metástasis y, por lo tanto, presentan otro obstáculo más para el desarrollo de ADC. El documento WO200710674 desvela conjugados de anticuerpo anti-5T4-fármaco.

30 Los ADC anti-5T4 de la presente invención superan los retos asociados con la tecnología ADC y proporcionan ADC altamente específicos y potentes que se unen a células tumorales que expresan el antígeno 5T4 y suministran suficiente fármaco citotóxico a las células, proporcionando de ese modo un tratamiento innovador y eficaz para el cáncer.

**Sumario**

35 El conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención tiene la fórmula: Ab-(LU-D)<sub>p</sub> o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que, Ab es un anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene un región CDR1 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 5, una región CDR2 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 6, y una región CDR3 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 7; LU es una unidad enlazadora seleccionada del grupo que consiste en maleimidocaproilo y maleimidocaproil-Val-Cit-PABA ; *p* es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 8; y D es una unidad de fármaco seleccionada del grupo que consiste en MMAE, MMAF, y MMAD.

40 La presente divulgación proporciona adicionalmente conjugados de anticuerpo anti-5T4-fármaco, en los que dicho anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada que tiene (a) una región CDR1 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 5, (b) una región CDR2 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 6, y (c) una región CDR3 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 7.

45 La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco, en el que dicho anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena ligera que tiene (a) una región CDR1 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 8, (b) una región CDR2 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 9, y (c) una región CDR3 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 10.

50 La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco, en el que dicho anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, comprende adicionalmente una región variable de cadena pesada que tiene (a) una región CDR1 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 5, (b) una región CDR2 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 6, y (c) una región CDR3 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene (a) una región CDR1 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 8, (b) una región CDR2 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 9, y (c) una región CDR3 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 10.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco, en el que dicho anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, comprende la región VH de la SEQ ID NO: 3 y la región VL de la SEQ ID NO: 4.

5 La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco, en el que dicho anticuerpo anti-5T4 consiste en la cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco en el que:

- 10 (a) dicho anticuerpo anti-5T4 consiste en una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2,  
(b) dicha LU es maleimidocaproilo,  
(c) dicho fármaco es MMAF, y  
(d) p es un número entero de aproximadamente 4.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco en el que:

- 15 (a) dicho anticuerpo anti-5T4 consiste en una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2,  
(b) dicha LU es maleimidocaproil-Val-Cit-PABA,  
(c) dicho fármaco es MMAE, y  
(d) p es un número entero de aproximadamente 4.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco en el que:

- 20 (a) dicho anticuerpo anti-5T4 consiste en una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2,  
(b) dicha LU es maleimidocaproil-Val-Cit-PABA,  
(c) dicho fármaco es MMAD, y  
(d) p es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.

25 La presente divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco en el que: (a) dicho anticuerpo anti-5T4 consiste en una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2, (b) dicha LU es maleimidocaproil-Val-Cit-PABA, (c) dicho fármaco es MMAE, y (d) p es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.

30 La presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco, en el que dicho anticuerpo reconoce un epítipo en el antígeno 5T4 humano, en el que dicho epítipo comprende los restos de aminoácido 173-258 y 282-361 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo-fármaco indicado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 La presente divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento de tratamiento de un cáncer 5T4 positivo en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente un conjugado de anticuerpo-fármaco indicado anteriormente.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento de tratamiento de un cáncer 5T4 positivo en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas de vejiga, mama, cuello del útero, colon, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovario, próstata, páncreas, hígado, piel, estómago y testículos.

40 Más preferentemente, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un cáncer 5T4 positivo en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas colorrectal, de mama, pancreático y pulmonar no microcítico.

La divulgación proporciona adicionalmente un conjugado de anticuerpo-fármaco indicado anteriormente para su uso en terapia.

45 La divulgación comprende adicionalmente el uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco indicado anteriormente para la fabricación de un medicamento.

La divulgación proporciona adicionalmente el uso indicado anteriormente, en el que dicho uso es para el tratamiento de un cáncer 5T4 positivo y en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas de la vejiga, mama, cuello del útero, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovario, próstata, páncreas, piel, estómago y testículos.

50 Más preferentemente, la divulgación proporciona adicionalmente el uso indicado anteriormente, en el que dicho uso es para el tratamiento de un cáncer 5T4 positivo en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas colorrectal, de mama, pancreático y pulmonar no microcítico.

La divulgación proporciona adicionalmente un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-5T4, un vector que comprende dicho ácido nucleico y una célula huésped que comprende dicho vector.

La divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento para producir un anticuerpo anti-5T4 que comprende cultivar la célula huésped que comprende el vector mencionado anteriormente y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

La divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento para producir un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco que comprende: (a) recoger el anticuerpo recuperado del cultivo celular, (b) unir químicamente dicho anticuerpo mediante una unidad enlazadora seleccionada del grupo que consiste en maleimidocaproilo o maleimidocaproil-Val-Cit a una unidad de fármaco seleccionada del grupo que consiste en MMAE, MMAD, o MMAF, y (c) purificar el conjugado de anticuerpo-fármaco.

### **Descripción detallada**

La presente divulgación proporciona conjugados de anticuerpo anti-5T4-fármaco para el tratamiento del cáncer. Para que la presente invención se comprenda más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

Todas las abreviaturas de aminoácidos usadas en esta divulgación son las aceptadas por la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos expuestas en 37 C.F.R. § 1.822 (B)(l).

5T4 se refiere al antígeno oncofetal 5T4, una glucoproteína transmembrana altamente glucosilada de 72 kDa que comprende un núcleo no glucosilado de 42 kDa (véase, el documento US 5.869.053). 5T4 humano se expresa en numerosos tipos de cáncer, incluyendo carcinomas de vejiga, mama, cuello del útero, colon, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovario, próstata, páncreas, hígado, piel, estómago y testículos. Las células altamente tumorigénicas, también llamadas células madre cancerosas o células iniciadoras del tumor han demostrado tener altos niveles de expresión de 5T4 (documento WO2010/111659). Los anticuerpos anti-5T4 de la invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente al antígeno 5T4 humano (véase el documento US 2007/0231333).

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o una cadena individual de los mismos, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno que incluye, por ejemplo, sin limitación Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, un fragmento de Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, scFv, anticuerpos de un único dominio (por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélido), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, díacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv.

Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase del mismo), y el anticuerpo no tiene que ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de su unidad y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada de anticuerpo, sola o en combinación. Como se sabe en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones flanqueantes (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables, que contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Si se desean variantes de una región variable concreta, particularmente con sustitución en restos de aminoácido fuera de una región CDR (es decir, en la región flanqueante), pueden identificarse sustituciones apropiadas de aminoácidos, preferentemente, sustituciones conservativas de aminoácidos, comparando la región variable concreta con las regiones variable de otros anticuerpos que contienen secuencias CDR1 y CDR2 en la misma clase canónica que la región variable concreta (Chothia y Lesk, J Mol Biol 196(4): 901-917, 1987). Cuando se elige FR para flanquear las CDR concretas, por ejemplo, cuando se humaniza u optimiza un anticuerpo, se prefiere las FR de anticuerpos que contienen secuencias CDR1 y CDR2 en la misma clase canónica.

Una "CDR" de un dominio variable son restos de aminoácido dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación tanto de Kabat como de Chothia, AbM, las definiciones de contacto y/o conformacionales o cualquier procedimiento de determinación de CDR bien conocido en la técnica. Las CDR del anticuerpo pueden identificarse como regiones hipervariables originalmente identificadas por Kabat y col. Véase, por ejemplo, Kabat y col., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public

Health Service, NIH, Washington, D.C. Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de bucle estructural originalmente descritas por Chothia y otros. Véase, por ejemplo, Chothia y col., 1989, Nature 342:877-883. Otros enfoques para la identificación de CDR incluyen la "definición de AbM" que es un término medio entre Kabat y Chothia y se obtiene usando el software de modelado de anticuerpo AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®), o la "definición de contacto" de CDR basada en contactos observados de antígeno, expuesto en MacCallum y col., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. En otro enfoque, mencionado en el presente documento como "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los restos que hacen contribuciones entálpicas a la unión de antígeno. Véase, por ejemplo, Makabe y col., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero no obstante solaparán con al menos una parte de las CDR de Kabat, aunque pueden estar acortadas o ampliadas a la luz de la predicción o hallazgos experimentales de que restos particulares o grupos de restos o incluso CDR completas no impactan significativamente sobre la unión al antígeno. Como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquier enfoque conocido en la técnica, incluyendo combinaciones de enfoques. Los procedimientos usados en el presente documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, ampliado, AbM, de contacto y/o conformacionales.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (Mab) se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una única copia o clon, incluyendo, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o fágico, y no el procedimiento por el cual se produce. Preferentemente, un anticuerpo monoclonal de la invención existe en una población homogénea o sustancialmente homogénea.

Anticuerpo "humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor están remplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

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

Los anticuerpos de la invención pueden producirse usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación en fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de dichas tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45: 1628-50 (1999) y Fellouse, F.A., y col, J. Mol. Biol., 373(4):924-40 (2007)).

Las Tablas 1 y 2 a continuación representan CDR preferidas para los anticuerpos de la presente invención.

**Tabla 1**

Anticuerpo	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A1	KASQSVSNDVA SEQ ID NO: 8	FATNRYT SEQ ID NO: 9	QQDYSSPWT SEQ ID NO: 10
A3	KASQDVDTAVA SEQ ID NO: 17	WASTRLT SEQ ID NO: 18	QQYSSYPYT SEQ ID NO: 19

**Tabla 2**

Anticuerpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A1	NFGMN SEQ ID NO: 5	WINTNTGEPYAEFEKFG SEQ ID NO: 6	DWDGAYFFDY SEQ ID NO: 7
A1-IgG4	GYTFTNFGMN SEQ ID NO: 14	WINTNTGEPYAEFEKFG SEQ ID NO: 6	DWDGAYFFDY SEQ ID NO: 7
A3	TYAMN SEQ ID NO: 22	RIRSKSNYATYYADSVKD SEQ ID NO: 23	QWDYDVRAMNY SEQ ID NO: 24

La presente invención incluye un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que comprende:

a) una región variable de cadena ligera que comprende:

i) una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID

NO: 8 y 17;

ii) una LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9 y 18; y

iii) una LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10 y 19; y

b) una región variable de cadena pesada que comprende:

i) una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5 y 22;

ii) una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6 y 23; y

iii) una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7 y 24.

Un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo preferido, de la invención comprende:

a) una LCVR que comprende: una LCDR1 de la SEQ ID NO: 8, una LCDR2 de la SEQ ID NO: 9, y una LCDR3 de la SEQ ID NO: 10; y

b) una HCVR que comprende: una HCDR1 de la SEQ ID NO: 5, una HCDR2 de la SEQ ID NO: 6, y una HCDR3 de la SEQ ID NO: 7.

Los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención se mencionan en el presente documento como A1 (un anticuerpo IgG1 anti-5T4 humanizado); A1-IgG4 (un anticuerpo IgG4 anti-5T4 humanizado); A3 (un anticuerpo quimérico de ratón/humano); y A3hu (un anticuerpo IgG1 anti-5T4 humanizado). Las SEQ ID NO de las secuencias de aminoácidos que codifican los Mab A1, A1-IgG4 y A3 se proporcionan en la Tabla 3 a continuación:

**Tabla 3**

Mab	LC	HC	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A1	2	1	4	8	9	10	3	5	6	7
A1-IgG4	2	12	4	8	9	10	13	5	6	7
A3	2	15	21	22	23	24	16	17	18	19
A3hu	30	25	31	32	33	34	26	27	28	29

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de forma intercambiable en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco se refiere a un anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento unido a un resto de fármaco citotóxico (D) mediante una molécula de unidad enlazadora (LU).

Unidad enlazadora (LU): LU describe el enlace directo o indirecto del anticuerpo al fármaco. La unión de un enlazar a un mAb puede conseguirse en una diversidad de modos, tales como a través de lisinas superficiales, acoplamiento reductor a carbohidratos oxidados y a través de restos de cisteína liberados por la reducción de enlaces disulfuro intercatenarios. Se conoce una diversidad de sistemas de enlace ADC en la técnica, incluyendo enlaces basados en hidrazona, disulfuro y péptido.

Fármaco (D): Un fármaco es cualquier sustancia que tenga actividad biológica o detectable, por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores detectables, agentes de unión, etc., y profármacos, que se metabolizan en un agente activo *in vivo*. Los términos fármaco y carga se usan de forma intercambiable. En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, tal como auristatina E (también conocida en la técnica como derivado de dolastatina-10) o un derivado de la misma. La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y estructura de auristatinas ejemplares se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 6.884.869, 7.098.308, 7.256.257, 7.423.116, 7.498.298 y 7.745.394, cada una de las cuales se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad y para todos los fines.

Las auristatinas han demostrado interferir con la dinámica de microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad antineoplásica. Las auristatinas de la presente invención se unen a tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre una célula o línea celular que exprese 5T4. Existen varios ensayos diferentes,

conocidos en la técnica, que pueden usarse para determinar si una auristatina o conjugado de anticuerpo-fármaco resultante ejerce un efecto citostático o citotóxico sobre una célula o línea celular deseada. Los procedimientos para determinar si un compuesto se une a tubulina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Muller y col., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel y col., Molecular Pharmacology, 1995 47: 965-976; y Hamel y col., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149.

Ejemplos de fármacos o cargas se seleccionan del grupo que consiste en DM1 (maitansina, N2'-desacetil-N2'-(3-mercaptopropil)- o N2'-desacetil-N2'-(3-mercaptopropil)-maitansina), mc-MMAD (6-maleimidocaproil-monometilauristatina-D o N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(2-tiazolil)etil]amino]propil]-1-pirrolidinil]-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-(9CI)-L-valinamida), mc-MMAF (maleimidocaproil-monometilauristatina F o N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-N-metil-L-valil-L-valil-(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoil-( $\alpha$ R, $\beta$ R,2S)- $\beta$ -metoxi- $\alpha$ -metil-2-pirrolidinoheptanoil-L-fenilalanina) y mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-maleimidocaproil-Val-cCit-(p-aminobenciloxycarbonil)-monometilauristatina E o N-[[[4-[[N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxo-hexil]-L-valil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil]amino]fenil]metoxi]carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]-1-pirrolidinil]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida). DM1 es un derivado del inhibidor de tubulina maitansina mientras que MMAD, MMAE, y MMAF son derivados de auristatina. Las cargas preferidas de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en mc-MMAF y mc-Val-Cit-PABA-MMAE.

El término "epítipo" se refiere a esa parte de una molécula capaz de reconocerse por y unirse por un anticuerpo en una o más de las regiones de unión a antígeno del anticuerpo. Los epítipos a menudo consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. La expresión "epítipo antigénico" como se usa en el presente documento, se define como una parte de un polipéptido al que puede unirse específicamente un anticuerpo como se determina por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos convencionales. Un "epítipo no lineal" o "epítipo conformacional" comprende polipéptidos no contiguos (o aminoácidos) dentro la proteína antigénica a la que se une un anticuerpo específico para el epítipo.

La expresión "afinidad de unión ( $K_D$ )" como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la tasa de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La  $K_D$  es la relación de la tasa de disociación, también llamada la "velocidad de desactivación ( $k_{off}$ )" a la tasa de asociación, o "velocidad de activación ( $k_{on}$ )". Por tanto,  $K_D$  es igual a  $k_{off}/k_{on}$  y se expresa como una concentración molar (M). De lo que se deduce que cuanto más pequeña sea la  $K_D$ , más fuerte será la afinidad de unión. Por lo tanto, una  $K_D$  de 1  $\mu$ M indica débil afinidad de unión en comparación con una  $K_D$  de 1 nM. Los valores de  $K_D$  para los anticuerpos pueden determinarse usando procedimientos bien establecidos en la técnica. Un procedimiento para determinar la  $K_D$  de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial (SPR), típicamente usando un sistema biodetector tal como un sistema Biacore®.

La expresión "se une específicamente" como se usa en el presente documento en referencia a la unión entre un anticuerpo y un antígeno 5T4 y el anticuerpo, se une al antígeno 5T4 con una  $K_D$  menos de aproximadamente 30 nM como se determina por SPR a 25 °C.

Sal farmacéuticamente aceptable como se usa en el presente documento se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de una molécula o macromolécula.

El término "potencia" es una medición de la actividad biológica y puede denominarse como  $CI_{50}$ , o concentración eficaz del anticuerpo necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento de una línea celular 5T4 positiva como se describe en el Ejemplo 3. Como alternativa, la potencia puede referirse a actividad antitumoral determinada en un modelo de xenoinjerto tumoral *in vivo* como se muestra en el Ejemplo 4.

Los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente ADN bicatenario.

Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención pueden incluir lo siguiente: solamente la secuencia codificante para la variante, la secuencia codificante para la variante y secuencias codificantes adicionales tales como un polipéptido funcional, o una secuencia señal o de secreción o una secuencia pro-proteína; la secuencia codificante para el anticuerpo y la secuencia no codificante, tal como intrones o secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante para el anticuerpo. La expresión "polinucleótido que codifica un anticuerpo" abarca un polinucleótido que incluye secuencias codificantes adicionales para la variante pero también un polinucleótido que incluye secuencia codificante adicional y/o secuencia no codificante. Se sabe en la técnica que una secuencia polinucleotídica que está optimizada para una célula huésped/sistema de expresión específico puede obtenerse fácilmente a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína deseada (véase, GENEART® AG, Regensburg, Alemania).

Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención típicamente incluirán una secuencia polinucleotídica de control de la expresión unida de forma funcional a las secuencias codificantes del anticuerpo, incluyendo regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas conocidas en la técnica. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para huéspedes procariontes. Una vez se ha incorporado el vector en la línea celular huésped apropiada, la célula huésped se propaga en condiciones adecuadas para expresar las secuencias de nucleótidos y, según se desee, para la recogida y purificación de los anticuerpos. Las líneas celulares eucariotas preferidas incluyen las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, linfocitos-B transformados o líneas celulares de riñón embrionario humano. La célula huésped más preferida es una línea celular CHO.

La presente invención abarca anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos que se unen a un epítipo específico en el antígeno 5T4. El epítipo identificado es un epítipo no lineal o conformacional que comprende un primer contacto con el antígeno 5T4 humano (SEQ ID NO: 11) entre los restos de aminoácido 173 y 252 y que comprende un segundo contacto entre los restos de aminoácido 276 y 355 (véase el Ejemplo 7). Por tanto, las CDR y las regiones variable de cadena pesada y ligera descritas en el presente documento se usan para preparar anticuerpos de longitud completa así como fragmentos funcionales y análogos que mantienen la afinidad de unión de la proteína empleando las CDR específicas para el epítipo mencionado anteriormente del antígeno 5T4.

La afinidad de unión de los anticuerpos de la presente invención se determina usando SPR (Ejemplo 6). En estos experimentos, los antígenos 5T4 se inmovilizan a bajas densidades en un chip Biacore® y los anticuerpos se pasan de forma fluida. Se mide la acumulación de masa en la superficie del chip. Este procedimiento analítico permite la determinación a tiempo real de las tasas de desactivación y activación para obtener la afinidad ( $K_D$ ) para la unión. Los anticuerpos humanizados de la presente invención tienen una  $K_D$  entre aproximadamente 0,30 y aproximadamente 30 nM; aproximadamente 0,30 y aproximadamente 20 nM; aproximadamente 0,30 y aproximadamente 10 nM; aproximadamente 0,5 y aproximadamente 7 nM; aproximadamente 1,0 y aproximadamente 5 nM; y aproximadamente 1,0 y aproximadamente 3 nM.

#### Conjugación de fármacos con un anticuerpo

El fármaco tiene, o se ha modificado para que incluya, un grupo reactivo con un punto de conjugación en el anticuerpo. Por ejemplo, un fármaco puede unirse por alquilación (por ejemplo, en las lisinas de grupo épsilon-amino o el extremo N-terminal de los anticuerpo), aminación reductora de carbohidrato oxidado, transesterificación entre grupos hidroxilo y carboxilo, amidación en grupos amino o grupos carboxilo, y conjugación con tioles. En algunas realizaciones, la cantidad de restos de fármaco,  $p$ , conjugados por molécula de anticuerpo varía de un promedio de 1 a 8; 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 a 2. En algunas realizaciones,  $p$  varía de un promedio de 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4 o 2 a 3. En otras realizaciones,  $p$  es un promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. En algunas realizaciones,  $p$  varía de un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 1 a aproximadamente 7, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2. En algunas realizaciones,  $p$  varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, de aproximadamente 2 a aproximadamente 7, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3. Para ejemplos de químicas que pueden usarse para la conjugación, véase, por ejemplo, Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, Inc.), Capítulo 15 (Chemical Modifications of Proteins).

Por ejemplo, cuando la activación química de la proteína provoca la formación de grupos tiol libres, la proteína puede conjugarse con un agente reactivo sulfhidrilo. En un aspecto, el agente es uno que es sustancialmente específico para grupos tiol libres. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, maleimida, haloacetamidas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haloésteres (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), halometil cetonas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), vinil sulfona y piridiltio.

#### Enlazadores

El fármaco puede unirse a un anticuerpo mediante un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible es típicamente susceptible a escisión en condiciones intracelulares. Los enlazadores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular, tal como la proteasa lisosómica o una proteasa endosómica. En realizaciones ejemplares, el enlazador puede ser un enlazador dipeptídico, tal como valina-citrulina (val-cit), un enlazador de fenilalanina-lisina (phe-lys), o enlazador de maleimidocaprónico-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (mc-Val-Cit-PABA). Otro enlazador es sulfosuccinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (smcc). La conjugación sulfo-smcc sucede mediante un grupo maleimida que reacciona con sulfhidrilos (tioles, -SH), mientras que su éster Sulfo-NHS es reactivo hacia aminas primarias (que se encuentran en lisina y el extremo N-terminal de la proteína o péptido). Otro enlazador más es maleimidocaproilo (mc). Otros enlazadores adecuados incluyen enlazadores que se pueden hidrolizar a un pH o intervalo de pH específico, tal como un enlazador de hidrazona. Los enlazadores escindibles adecuados adicionales incluyen enlazadores disulfuro. El enlazador puede unirse covalentemente al anticuerpo de modo que deba degradarse una cantidad de ese

anticuerpo de forma intracelular para que el fármaco se libere, por ejemplo, el enlazador mc.

Un enlazador puede incluir un grupo para la unión al anticuerpo. Por ejemplo, el enlazador puede incluir grupos reactivos amino, hidroxilo, carboxilo o sulfhidrilo (por ejemplo, maleimida, haloacetamidas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haloésteres (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), halometil cetonas (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (por ejemplo, yodo, bromo o cloro), vinilsulfona y piridiltio). Véase en líneas generales Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking; CRC Press, Inc., Boca Ratón, 1991.

#### Inmunoterapia

Para inmunoterapia, un anticuerpo puede conjugarse a un fármaco adecuado, tal como un agente citotóxico o citostático, un agente inmunosupresor, un radioisótopo, un toxina o similares. El conjugado puede usarse para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosas, causar apoptosis en una célula tumoral o cancerosa o para tratar el cáncer en un paciente. El conjugado puede usarse por consiguiente en una diversidad de entornos para el tratamiento de cánceres en animales. El conjugado puede usarse para suministrar un fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin limitarse a teoría alguna, en algunas realizaciones, el conjugado se une o se asocia con un antígeno asociado a célula cancerosa o tumor, y el conjugado y/o el fármaco pueden recogerse dentro una célula tumoral o célula cancerosa a través de endocitosis mediada por receptor. El antígeno puede unirse a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas dentro del conjugado (por ejemplo, en un enlazador) se escinden hidrolíticamente por una o más proteasas asociadas a célula tumoral o célula cancerosa, provocando la liberación del fármaco. El fármaco liberado entonces está libre para migrar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas u otras actividades. En algunas realizaciones, el fármaco se escinde del anticuerpo fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el fármaco posteriormente penetra en la célula, o actúa en la superficie celular.

#### Terapia para el cáncer

Como se ha analizado anteriormente, los cánceres, incluyendo, aunque sin limitación, un tumor, metástasis u otra enfermedad o trastorno caracterizado por crecimiento celular incontrolado, puede tratarse o prevenirse por la administración de un conjugado de proteína-fármaco.

En otras realizaciones, se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir el cáncer, incluyendo la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un conjugado y un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es aquel con el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea refractario. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es aquel con el que se ha encontrado que el tratamiento del cáncer es refractario. El conjugado puede administrarse a un paciente que también ha experimentado un tratamiento, tal como cirugía para el tratamiento contra el cáncer. En otra realización, el procedimiento adicional de tratamiento es radioterapia.

#### Terapia de múltiples fármacos para el cáncer

Los procedimientos para tratar el cáncer incluyen administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco y otro agente terapéutico que es un agente antineoplásico. Los agentes antineoplásicos adecuados incluyen, metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatina, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, topotecán, mostazas de nitrógeno, citoxano, etopósido, 5-fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorrubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, calicheamicina, y docetaxel.

Los ADC de la presente invención pueden estar en forma de una composición farmacéutica para su administración que se formulan para sean apropiados para el modo seleccionado de administración, y diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes, vehículos y similares. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 18ª ed., 1995, proporciona un compendio de técnicas de formulación que son conocidas en líneas generales para los facultativos.

Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier medio conocido en la técnica que consiga el propósito generalmente pretendido para tratar el cáncer. La vía preferida de administración es parenteral, definida en el presente documento como referida a modos de administración que incluyen, aunque sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea e intraarticular. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud y peso del destinatario, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

Las composiciones dentro del alcance de la invención incluyen todas las composiciones en las que un ADC está presente en una cantidad que es eficaz para conseguir el efecto médico deseado para tratar el cáncer. Aunque las necesidades individuales pueden variar de un paciente a otro, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de todos los componentes está dentro de la capacidad del especialista de la técnica habitual.

**Ejemplo 1****Preparación de un ADC anti-5T4**

El conjugado de anticuerpo 5T4-A1-fármaco (ADC) se prepara mediante reducción parcial del mAb con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) seguido por reacción de los restos Cys reducidos con el enlazador terminado en maleimida-carga deseado. En particular, el mAb 5T4-A1 se reduce parcialmente mediante la adición de un exceso molar de 2,8 de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en HEPES (tampón de ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacinaetanosulfónico) 100 mM, pH 7,0 y ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) 1 mM durante 2 h a 37 °C. El enlazador-carga deseado después se añade a la mezcla de reacción a una relación molar de enlazador-carga/mAb-tiol de 5,5 (maleimidocaprónico-monometilauristatina F [mc-MMAF]) u 8 (maleimidocaprónico-valina-citrolina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatina E [mc-Val-Cit-PABA-MMAE]) y se hace reaccionar durante 1 hora adicional a 25 °C en presencia de un 15 % v/v de dimetilacetamida (DMA). Después del período de incubación de 1 hora, se añade N-etilmaleimida (exceso de factor 4,5 para mc-MMAF y exceso de factor 2 para mc-Val-Cit-PABA-MMAE) para tapar los tioles sin reaccionar y se deja reaccionar durante 15 minutos seguido por la adición de un exceso de factor 6 de L-Cys para inactivar cualquier enlazador-carga sin reaccionar. La mezcla de reacción se dializa durante una noche a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, y se purifica mediante SEC (AKTA explorer, columna Superdex 200 10/30 GL). El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) para la pureza, cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI/MS) para calcular la carga y la concentración se determina mediante un espectrofotómetro de UV.

**Ejemplo 2****Estudios de unión**

Las células que expresan el antígeno 5T4, y las células Raji de control negativo, se siembran a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo no tisular y se mantienen en hielo. Las diluciones de los anticuerpos A1 y A1-IgG4 o ADC A1-mcMMAF se hacen en albúmina sérica bovina BSA al 3% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y se añade a la placa a una concentración final de 10 µg/ml. Las placas después se incuban en hielo durante 1 hora, seguido por 2 lavados. El anticuerpo secundario, de cabra anti-Fc de IgG humana conjugado con PE (ficoeritrina) se añade a los pocillos. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, entonces se mide la intensidad de fluorescencia media usando un citómetro de flujo.

Los datos en la Tabla 4 indican que el anticuerpo A1 se une a un panel diverso de líneas celulares 5T4 positivas. Los datos en la Tabla 5 indican que se observa unión similar en varias líneas celulares diferentes con los anticuerpos A1 y A1-IgG4 así como el ADC A1-mcMMAF.

**Tabla 4**

<b>Líneas Celulares Humanas</b>	<b>Intensidad Fluorescente Media del Anticuerpo A1</b>
MDAMB435/5T4 (melanoma)	15000
MDAMB468 (mama)	3000
MDAMD361-DYT2 (mama)	4500
NCI-H157 (pulmón)	4100
A431 (epitelial)	2000
Caki (riñón)	2500
PC3mm2 (próstata)	4500
PC14PE6 (pulmón)	3200
Panc1 (pancreática)	3500
BxPC3 (pancreática)	1000
Su8686 (pancreática)	3700
H1975	1600
37622A - (células de cáncer pulmonar primario)	10600
Raji (control negativo)	<100

Tabla 5

Intensidad Fluorescente Media					
Líneas Celulares	A1	A1-mcMMAF	A1-IGG4	A1-IGG4-CM	IgG de control
MDAMD361-DYT2	7000	6900	5500	4800	<100
A431	3900	3400	2400	2000	<100
MDAMB468	3500	2800	2500	1800	<100
PC3mm2	3400	2700	2100	1500	<100
Raji	<200	<200	<200	<100	<100

**Ejemplo 3****Ensayo de citotoxicidad**

- 5 Las líneas celulares que expresan 5T4, y la línea celular Raji de control negativo, se cultivan con concentraciones crecientes de ADC. Después de cuatro días, se evalúa la viabilidad de cada cultivo. Se calculan los valores de  $Cl_{50}$  por regresión no lineal logística y se presentan como ng de Ab/ml. Se demuestra que A1-mcMMAF, A1-vcMMAE, A3-mcMMAF y A3-vcMMAE inhiben el crecimiento de líneas celulares que expresan 5T4 (MDAMB435/5T4, MDAMB468, y MDAMB361 DYT2), siendo inactivos sobre células 5T4 negativas (Raji), Tabla 6.

10

Tabla 6

ADC	$Cl_{50}$ (ng Ab/ml)			
	MDAMB435/5T4	MDAMB361DYT2	MDAMB468	Raji (5T4-)
A1-mcMMAF	1,3	104,2	534,2	>45.000
A1-vcMMAE	6,8	157,7	7667	>45.000
A3-mcMMAF	0,3	31,0	27,7	>45.000
A3-vcMMAE	3,5	86,8	160,6	>45.000
Ab-mcMMAF sin unión	21258	~ 50,000	73059	>45.000
Ab- vcMMAE sin unión	7979	27650	23819	>45.000

15

Adicionalmente, se aíslan células 37622a de tumor pulmonar primario 5T4+ y se cultivan en cultivo. Las células se cultivan con concentraciones crecientes de ADC. Diez días después, se evalúa la viabilidad de cada cultivo usando el procedimiento MTS. Se calculan los valores de  $Cl_{50}$  por regresión no lineal logística y se presentan como ng de Ab/ml. A1-mcMMAF, A1-vcMMAE, A3-mcMMAF, y A3-vcMMAE inhiben el crecimiento de las células de tumor pulmonar primario, Tabla 7.

Tabla 7

	$Cl_{50}$ de pulmón primario 37622a (ng Ab/ml)
ADC	
A1-mcMMAF	504,1
A1-vcMMAE	443,1
A3-mcMMAF	77,2
A3-vcMMAE	78,1
Ab-mcMMAF sin unión	>45.000

**Ejemplo 4**

**Modelo de xenoinjerto subcutáneo**

5 A ratones atímicos (desnudos) hembra (u otra cepa de ratones inmunosuprimidos) se les inyecta s.c. MDAMB435/5T4, MDAMB361DYT2, o células tumorales H1975. A los ratones con tumores estadificados, se les administra por vía intravenosas aproximadamente 0,1 a 0,3 g (n=6 para 10 ratones/grupo de tratamiento) Q4Dx4 de solución salina normal (vehículo), A1-mcMMAF, A1-vcMMAE, A1-mcMMAD, A1-smccDM1, A3-mcMMAF, A3-vcMMAE, o un anticuerpo de control sin unión conjugado a mcMMAF o vcMMAE, a la dosis de 3 mg Ab/kg. Todos los ADC se dosifican basándose en el contenido de Ab. Los tumores se miden al menos una vez a la semana y se calcula su tamaño ( $\text{mm}^2 \pm \text{ETM}$ ) como  $\text{mm}^2 = 0,5 \times (\text{anchura del tumor}^2) \times (\text{longitud del tumor})$ .

10 Los datos en el Tabla 8 indican que A1-mcMMAF, A1-vcMMAE, A1-vcMMAD, A3-mcMMAF, y A3-vcMMAE inhiben el crecimiento de xenoinjertos MDAMB435/5T4 mientras que A1-mcMMAD y A1-smccDM1 no eran activos en este modelo.

15 Los datos en la Tabla 9 indican que A1-mcMMAF, A1-vcMMAE, A1-vcMMAD, A1-smccDM1, A3-mcMMAF, y A3-vcMMAE inhiben el crecimiento de xenoinjertos MDAMB361 DYT2 mientras que A1-mcMMAD no era activo en este modelo.

Los datos en el Tabla 10 indican que A1-mcMMAF, A1-vcMMAE, A1-vcMMAD, A3-mcMMAF, y A3-vcMMAE inhiben el crecimiento de xenoinjertos H1975 mientras que A1-mcMMAD y A1-smccDM1 no eran activos en este modelo.

**Tabla 8**

Compuesto (3 mg/kg Q4dx4)	Volumen del tumor de xenoinjertos MDAMB435/5T4 ( $\text{mm}^3$ , $x \pm \text{etm}$ )				
	Día 0	Día 17	Día 42	Día 65	Día 85
Vehículo	169 ± 8	531 ± 73	1255 ± 190	GT	GT
A1 mcMMAF	168 v 15	53 ± 12	67 ± 56	174 ± 119	364 ± 278
A1 vcMMAE	168 ± 8	4 ± 4	10 ± 10	91 ± 91	200 ± 200
A1 mcMMAD	168 ± 12	390 ± 112	GT	GT	GT
A1 smccDM1	174 ± 10	429 ± 62	1255 ± 227	1781 ± 388	GT
A1 vcMMAD	169 ± 12	17 ± 7	0 ± 0	0 ± 0	0±0
A3 mcMMAF	174 ± 12	105 ± 27	216 ± 143	448 ± 220	GT
A3 vcMMAE	172 ± 13	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ab mcMMAF sin unión	170 ± 11	100 ± 15	314 ± 121	838 ± 381	GT
Ab vcMMAE sin unión	172 ± 11	168 ± 53	461 ± 178	GT	GT

GT= grupo terminado debido al gran tamaño del tumor

20

**Tabla 9**

Compuesto (3 mg/kg Q4dx4)	Volumen del tumor de xenoinjertos MDAMB361 DYT2 ( $\text{mm}^3$ , $x \pm \text{etm}$ )				
	Día 0	Día 19	Día 47	Día 90	Día 131
Vehículo	353 ± 10	363 ± 58	558 ± 149	1117±348	GT
A1 mcMMAF	348 ± 14	76 ± 32	0 ± 0	7 ± 7	11 ± 11
A1 vcMMAE	356 ± 11	86 ± 8	0 ± 0	9 ± 9	34 ± 27
A1 vcMMAD	352 ± 26	130 ± 15	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
A3 mcMMAF	342 ± 23	128 ± 10	79 ± 30	105 ± 49	353 ± 234
A3 vcMMAE	354 ± 21	111 ± 20	21 ± 21	72 ± 72	155 ± 155

(continuación)

Compuesto (3 mg/kg Q4dx4)	Volumen del tumor de xenoinjertos MDAMB361 DYT2 (mm <sup>3</sup> , x ± etm)				
	Día 0	Día 19	Día 47	Día 90	Día 131
A1 mcMMAD	347 ± 15	380 ± 66	775 ± 199	GT	GT
A1 vcMMAD	352 ± 26	130 ± 15	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
A1 smccDM1	353 ± 25	123 ± 9	51 ± 25	98 ± 41	330 ± 146
Ab mcMMAF sin unión	342 ± 38	407 ± 93	869 ± 198	GT	GT
Ab vcMMAE sin unión	344 ± 20	303 ± 78	346 ± 185	595 ± 362	GT
GT= grupo terminado debido al gran tamaño del tumor					

Tabla 10

Compuesto	Dosis (mg/kg) Q4dx4	Volumen del tumor de xenoinjertos H1975 (mm <sup>3</sup> , x ± etm)				
		Día 0	Día 8	Día 15	Día 22	Día 40
Vehículo		423 ± 14	1154 ± 136	2229 ± 240	GT	GT
A1 mcMMAF	3	425 ± 14	619 ± 46	519 ± 45	581 ± 79	2840 ± 207
A1 vcMMAE	3	425 ± 12	702 ± 45	929 ± 90	926 ± 116	GT
A1 vcMMAD	3	427 ± 18	739 ± 59	467 ± 19	240 ± 14	625 ± 317
A3 mcMMAF	3	426 ± 10	980 ± 79	1343 ± 140	1261 ± 203	GT
A3 vcMMAE	3	431 ± 14	944 ± 52	993 ± 71	GT	GT
A1 mcMMAD	3	427 ± 16	837 ± 69	1468 ± 139	GT	GT
A1 smccDM1	3	423 ± 18	901 ± 83	1852 ± 167	GT	GT
Ab-mcMMAF sin unión	3	423 ± 16	1026 ± 68	1861 ± 224	GT	GT
Ab-vcMMAE sin unión	3	427 ± 13	1213 ± 67	1959 ± 139	GT	GT
GT= grupo terminado debido al gran tamaño del tumor						

5

Como alternativa, ratones desnudos con xenoinjertos de células tumorales primarias 37622a establecidos de forma subcutánea se tratan iv Q4Dx4 con A1-mcMMAF, A1-mcMMAD, A1-vcMMAD, o A3-mcMMAF a la dosis de 3 mg de Ab/kg y se controla el crecimiento del tumor durante el período de 96 días. La Tabla 11 demuestra que A1-mcMMAF, A1-vcMMAD y A3-mcMMAF inhiben el crecimiento de xenoinjertos de tumor primario 37622a en comparación con los animales tratados con control de vehículo mientras que A1-mcMMAD no era activo en este modelo.

10

Tabla 11

Compuesto	Dosis (mg/kg) Q4dx4	Volumen de xenoinjertos de tumor primario 37622a (mm <sup>3</sup> , x ± etm)				
		Día 1	Día 22	Día 46	Día 68	Día 96
Vehículo		111 ± 18	503 ± 155	1174 ± 247	GT	GT
A1-mcMMAF	3	111 ± 18	67 ± 11	124 ± 47	233 ± 105	357 ± 150
A1-mcMMAD	3	127 ± 28	376 ± 119	862 ± 377	GT	GT
A1-vcMMAD	3	108 ± 14	52 ± 14	13 ± 5	50 ± 37	160 ± 121

(continuación)

Compuesto	Volumen de xenoinjertos de tumor primario 37622a (mm <sup>3</sup> , x ± etm)					
	Dosis (mg/kg) Q4dx4	Día 1	Día 22	Día 46	Día 68	Día 96
A3-mcMMAF	3	131 ± 28	99 ± 26	211 ± 128	463 ± 210	GT
GT= grupo terminado debido al gran tamaño del tumor						

Inesperadamente, los datos en las Tablas 8-11 muestran que los ADC con el mismo anticuerpo y carga de fármaco, pero con diferentes enlazadores tenían un perfil diferente de eficacia, es decir, A1-mcMMAD frente a A1-vcMMAD en los cuatro modelos de xenoinjerto. Además, los datos muestran que los ADC con el mismo anticuerpo y enlazador, pero con diferente carga de fármaco también tenían un perfil diferente de eficacia, es decir, A1-mcMMAF frente a A1-mcMMAD, en los cuatro modelos de xenoinjerto. Por tanto, el fármaco MMAD es eficaz en los cuatro modelos de xenoinjerto cuando se unía al anticuerpo A1 por el enlazador vc pero no tiene actividad en ningún modelo de xenoinjerto ensayado cuando se unía por el enlazador mc. En contraste, el fármaco MMAF es muy eficaz en los 4 modelos de xenoinjerto cuando se unía al anticuerpo A1 con el enlazador mc mientras que el fármaco MMAD químicamente relacionado no tiene actividad en los 4 modelos de xenoinjerto cuando se unía al mismo anticuerpo por el mismo enlazador.

Se aprecia otra observación inesperada más con ADC A1-smccDM1 (Tablas 8-10). Este ADC era muy eficaz contra el xenoinjerto MDAMB361 DYT2 pero esencialmente no tenía efecto contra los xenoinjertos MDAMB435/5T4 y H1975 aunque todos los xenoinjertos tienen una alta expresión del antígeno diana 5T4. Estos datos ilustran que la eficacia del enlazador-carga no puede predecirse incluso cuando se utiliza el mismo anticuerpo de alta afinidad o incluso cuando se usa el mismo ADC.

### Ejemplo 5

#### Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC)

##### Ensayo de ADCC:

Se recoge sangre de un voluntario sano en un tubo de preparación celular BD Vacutainer CPT con heparina sódica. Se recogen mononucleocitos de sangre periférica humana (PBMC) y se resuspenden en tampón de ensayo (RPMI 1640 suplementado con HEPES 10 mM) a  $2,5 \times 10^7$  células/ml. Las células diana (MDAMB435/5T4 o MDAMB435/neo) se siembran a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de ensayo de 96 pocillos. Se añade el anticuerpo A1 o A1-mcMMAF, después se distribuyen células efectoras PBMC humanas ( $5 \times 10^5$ ) en los pocillos para una relación de efector: célula diana (E:T) de 50:1. La placa de ensayo se incuba a 37 °C durante 4 horas para a actividad ADCC. La placa se recoge añadiendo un volumen igual de reactivo CytoTox-One (Promega). Se añade solución de parada (Promega; 50 µl) a cada pocillo y se cuantificó la liberación de lactato deshidrogenasa midiendo la intensidad de fluorescencia. Como control positivo, se añaden 2 µl de tampón de lisis por pocillo para generar una liberación máxima de LDH (citotoxicidad del 100 %) en los pocillos de control. El porcentaje de citotoxicidad se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Citotoxicidad Específica} = \frac{\text{experimental} - \text{espontánea efectora} - \text{espontánea diana}}{\text{máxima diana} - \text{espontánea diana}} \times 100$$

Cuando "experimental" corresponde a la señal medida en una de las condiciones experimentales, "espontánea efectora" corresponde a la señal medida en presencia de PBMC solamente, "espontánea diana" corresponde a la señal medida en presencia de células diana solamente, y "máxima diana" corresponde a la señal medida en presencia de células diana lisadas con detergente solamente.

La actividad ADCC de A1-IgG1 Ab y A1-mcMMAF en comparación con A1-IgG4 Ab se muestra en la Tabla 12. Tanto el anticuerpo A1 como A1-mcMMAF demuestran actividad ADCC comparable lo que indica que la actividad ADCC de A1-mcMMAF puede contribuir a su actividad antitumoral.

**Tabla 12**

Compuesto	% de Citotoxicidad
A1-IgG1	37 ± 8
A1-mcMMAF	34 ± 1
A1-IgG4	9 ± 5

**Ejemplo 6**

**Afinidad de unión**

Se realiza análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando el BIAcore® para determinar las constantes de afinidad para la unión de A1-IgG1 y A1-IgG4 a 5T4 humano o de cynomolgus a pH 6,0 y pH 7,4. La tecnología BIAcore® utiliza cambios en el índice de refracción en la capa superficial tras la unión de variantes del anticuerpo huA1 a la proteína 5T4 humana inmovilizada sobre la capa superficial. La unión se detecta por SPR de luz láser que se refracta desde la superficie. El análisis de la velocidad de activación y velocidad de desactivación de la cinética de la señal permite la discriminación entre interacciones no específicas y específicas. Las proteínas 5T4 usadas para este análisis consistían en el ectodominio 5T4 humano o de cynomolgus fusionado al dominio Fc de IgG1 humana y se inmovilizan bajas densidades (45,1 y 45,4 RU para ser humano y cynomolgus, respectivamente) en un chip CM5 para medir de forma precisa las constantes de afinidad.

La medición de la unión específica al ectodominio 5T4 se obtiene restando la unión a una superficie de referencia que tenía solamente proteína Fc de IgG1 humana inmovilizada en el chip CM5 a la misma densidad que en las superficies 5T4-Fc. A continuación, se inyectan diversas concentraciones de anticuerpos A1, A1-IgG4, o A3 en tampón HBS-EP pH 7,4 o MES-EP pH 6,0 sobre la superficie. La superficie se regenera dos veces con glicina pH 1,7 + tensioactivo P20 al 0,05 % (GE Healthcare, BR-1000-54) entre ciclos de inyección.

Los resultados muestran que A1 tiene una afinidad ligeramente mayor por 5T4 humano usando la superficie de 5T4 de baja densidad tanto a pH 6,0 como a pH 7,4 respecto a A1-IgG4 (factor 1,5 y factor 1,2 respectivamente, Tabla 13). Adicionalmente, A1 mostró unión ligeramente mejor a 5T4 de cynomolgus tanto a pH 6,0 como a pH 7,4 en comparación con A1-IgG4 (factor 1,7 y factor 1,2 respectivamente) y tanto A1 como A1-IgG4 se unían a 5T4 humano, 3 - 4 veces mejor que 5T4 de cynomolgus (Tabla 12).

**Tabla 13**

Anticuerpo	Antígeno	pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
A1-IgG1	hu5T4	6,0	4,31E+05	4,59E-04	1,06
A1-IgG4	hu5T4	6,0	6,26E+05	8,93E-04	1,43
A1-IgG1	cyno5T4	6,0	2,33E+05	6,41E-04	2,76
A1-IgG4	cyno5T4	6,0	2,02E+05	9,50E-04	4,70
A1-IgG1	hu5T4	7,4	2,75E+05	1,32E-04	0,48
A1-IgG4	hu5T4	7,4	3,28E+05	1,72E-04	0,52
A1-IgG1	cyno5T4	7,4	1,51E+05	2,73E-04	1,80
A1-IgG4	cyno5T4	7,4	1,81E+05	3,82E-04	2,11

Comparando los anticuerpos A1 y A3, es evidente que el anticuerpo A1 se une a 5T4 humano y de cynomolgus mejor a pH 7,4 respecto a pH 6,0 mientras que el anticuerpo A3 muestra unión potenciada a pH 6,0 en comparación con pH 7,4, Tabla 14.

**Tabla 14**

Anticuerpo	Antígeno	pH	ka (1/Ms) activación	kd (1/s) desactivación	KD (nM)
A1	hu5T4	6,0	4,31E+05	4,59E-04	1,06
A3	hu5T4	6,0	3,51E+05	4,17E-05	0,12
A1	cyno5T4	6,0	2,33E+05	6,41E-04	2,76
A3	cyno5T4	6,0	4,58E+05	1,87E-04	0,41
A1	hu5T4	7,4	2,75E+05	1,32E-04	0,48
A3	hu5T4	7,4	1,79E+05	3,06E-05	0,17
A1	cyno5T4	7,4	1,51E+05	2,73E-04	1,80
A3	cyno5T4	1,98E+05	1,62E-04	0,82	1,98E+05

**Ejemplo 7**

**Mapeo de epítomos usando quimeras de 5T4**

Para identificar los epítomos a los que se une cada uno de los anticuerpos A1 y A3, se realiza un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando (1) la construcción de ectodominio 5T4 con Fc y (2) construcciones de quimera de 5T4 humano/de ratón expresadas de forma transitoria en células COS-1. El ectodominio incluye la región aminoterminal, dos repeticiones ricas en leucina y la región hidrófila intermedia. Los ectodominios 5T4 de ratón y rata contienen una repetición directa de 6 aminoácidos dentro de su región hidrófila.

Las proteínas de fusión que contienen un ectodominio 5T4 y una región constante Fc de IgG1 humana se preparan usando 5T4 humano (aminoácidos 1-355), 5T4 de ratón (aminoácidos 1-361), 5T4 de rata (aminoácidos 1-361), 5T4 de mono cynomologus (aminoácidos 1-355), 5T4 de chimpancé (aminoácidos 1-355), y tífi de cola negra (aminoácidos 1-355). Los resultados de unión con construcciones de quimera de 5T4 humano/de ratón se resumen en la Tabla 14, que indica unión específica, unión parcial o ausencia de unión, por los anticuerpos A1 y A3.

La Tabla 15 se refiere a la capacidad de unión de los anticuerpos a las diversas quimeras humanas/de ratón y la nomenclatura se designa por el contenido de 5T4 de ratón. Cuando no se observa unión, esto indica que el anticuerpo se une a 5T4 humano ya que estos anticuerpos no se unen a 5T4 de ratón. Por ejemplo, el anticuerpo A3 tiene el epítopo de unión más N-terminal (entre 83 - 163) y esto se demuestra por la ausencia de unión a la quimera de 5T4 que tiene los restos 83 - 163 remplazados por 5T4 de ratón, por tanto A3 ya no puede unirse. Basándose en estos resultados, se determina que el anticuerpo A1 humanizado tiene un primer contacto con 5T4 humano entre los restos de aminoácido 173 y 252 y un segundo contacto con 5T4 humano entre los restos de aminoácido 276 y 355. El anticuerpo A3 se une a la primera región de repetición rica en leucina de 5T4 humano entre los restos de aminoácido 83 a 163. La cantidad de restos de aminoácido corresponde a la secuencia de aminoácidos del antígeno 5T4 humano de la SEQ ID NO: 11.

**Tabla 15**

Construcción de antígeno 5T4	Anticuerpo	
	A1	A3
Humano/de ratón 83-163	+	-
Humano/de ratón 173-361	-	+
Humano/de ratón 173-258	+/-	+
Humano/de ratón 282-361	+/-	+

**Ejemplo 8**

**Comparación del ADC A1-mcMMAF con el ADC A1-IgG4-CM**

A1-mcMMAF se compara con A1-IgG4-AcBut calicheamicina (A1-IgG4-CM) tanto para la seguridad como para la eficacia. A1-IgG4-CM está compuesto por el anticuerpo A1-IgG4 conjugado con el enlazador, AcBut [ácido-(4' acetilfenoxi) butanoico], a una carga de calicheamicina. Las calicheamicinas son potentes agentes antitumorales de una clase de antibióticos de enedina derivados de la bacteria *Micromonospora echinospora*.

La actividad de unión celular de Ab A1, Ab A1-IgG4, ADC A1-mcMMAF y ADC A1-IgG4-CM se comparan usando varias líneas celulares 5T4 positivas (véase el Ejemplo 2, Tabla 5). Los datos indican que se observa unión similar con los anticuerpos A1 y A1-IgG4 así como el ADC A1-mcMMAF, todos los cuales tienen una intensidad fluorescente media mayor que A1-IgG4-CM para todas las líneas celulares 5T4 positivas ensayadas.

A1-mcMMAF y A1-IgG4-CM se ensayan lado a lado en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de MDAMB435/5T4. Ambos ADC se dan *iv* (Q4dx2) cuando los tumores alcanzan aproximadamente 200 mm<sup>2</sup> de tamaño. La actividad antitumoral de A1-IgG4-CM a una dosis de 3 mg/kg es similar a la actividad antitumoral de A1-mcMMAF administrado a una dosis de 10 mg/kg (Tabla 16). Basándose en estos resultados, la actividad antitumoral de A1-IgG4-CM es aproximadamente 3,3 veces más potente que A1-mcMMAF.

**Tabla 16**

Compuesto	Dosis (mg/kg) Q4dx4	Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> , x ± etm)				
		Día 0	Día 7	Día 21	Día 31	Día 45
Vehículo	0	123 ± 8	195 ± 36	402 ± 56	635 ± 111	1309 ± 332

(continuación)

Compuesto	Dosis (mg/kg) Q4dx4	Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> , x ± etm)				
		Día 0	Día 7	Día 21	Día 31	Día 45
A1-mcMMAF	3	124 ± 11	121 ± 8	166 ± 29	227 ± 42	361 ± 89
A1-mcMMAF	10	123 ± 14	76 ± 11	0 ± 0	3 ± 3	2 ± 1
A1-IGG4-CM	3	121 ± 12	140 ± 15	32 ± 10	24 ± 10	26 ± 15

Podía esperarse que la potencia potenciada 3,3 veces de A1-IgG4-CM sobre la de A1-mcMMAF se tradujera en un margen de seguridad potenciado 3,3 veces de A1-mcMMAF sobre el de A1-IgG4-CM en un estudio de toxicidad en animales. Sin embargo, cuando se revisa el perfil de seguridad de A1-IgG4-CM en macacos cynomolgus, se determina que A1-IgG4-CM es al menos 100 más tóxico que A1-mcMMAF en el macaco cynomolgus. Cuando se administra A1-IgG4-CM a 0,032, 0,095 y 0,32 mg de Ab/kg/ciclo (2, 6, 20 mg calicheamicina/kg/ciclo) a macacos cynomolgus macho (n=3) y hembra (n=3), se observa toxicidad a cada nivel de dosis. Después de 2 ciclos (2 dosis), 4 de los 6 animales en el grupo de tratamiento de 0,095 se sacrificaron o se encontraron muertos. Por otro lado, no se observaron muertes a dosificaciones de hasta 10 mg/kg con A1-mcMMAF (247 µg de mcMMAF/kg/ciclo), después de 2 ciclos (2 dosis), sobre el mismo periodo de tiempo de 4 semanas. En resumen, el grupo de dosificación de 10 mg/kg de A1-mcMMAF es seguro mientras que el grupo de dosificación de 0,096 mg/kg de A1-IgG4-CM se considera tóxico cuando ambos se administran dos veces a macacos cynomolgus en un periodo de observación de 4 semanas.

Inesperadamente, estos resultados demuestran un margen de seguridad de factor 105 (10/0,095=105) de A1-mcMMAF sobre el de A1-IgG4-CM, en lugar del margen de seguridad de factor 3,3 esperado basado en la potencia antitumoral relativa de cada ADC. Estos datos revelan la naturaleza impredecible de los conjugados de anticuerpo-fármaco que utilizan anticuerpos contra la misma diana antigénica pero que se conjugan con una diferente carga de fármaco.

## 20 Ejemplo 9

### Modelado de PK/PD de ratón de A1-mcMMAF y predicciones de dosis clínica

El modelado de PK/PD se ha usado para cuantificar la respuesta tumoral de A1-mcMMAF en estudios de xenoinjertos de ratón, para determinar la concentración eficaz entre líneas celulares. El modelo de PK/PD de eliminación tumoral de compartimento transitorio usado se describió previamente por Simeoni *et al.* (Simeoni *et al.*, Cancer Res, 64:1094, (2004)). El modelo se ha modificado para tener en cuenta el crecimiento lineal, exponencial y logístico del tumor, y la inactivación por saturación por el fármaco. Los parámetros del modelo de PK/PD incluyen:

$k_{g\ ex}$	crecimiento exponencial
$k_g$	crecimiento logístico
$w_0$	volumen inicial del tumor
$\tau$	tasa de transducción
$k_{m\max}$	tasa máxima de inactivación
$kC_{50}$	concentración a la mitad de la tasa de inactivación máxima

Los resultados del modelado de PK/PD se usan para calcular la Concentración Estática de Tumor (TSC, Ecuación 1). Esta es la concentración de fármaco en que el crecimiento del tumor es igual a las tasas de muerte tumoral y el volumen del tumor permanece inalterado. La TSC puede definirse como la concentración mínima necesaria para la eficacia. Se usa TSC para proporcionar directrices sobre la selección de la dosis clínica, con concentraciones de >TSC necesarias para eficacia en clínica.

Para A1-mcMMAF, se determinó la PK de ratón en un estudio diferente (3mg/kg IV, ratones nu/nu atímicos hembra). Se completaron estudios de xenoinjerto de ratón usando 3 líneas celulares 5T4 diferentes con A1-mcMMAF administrado a niveles de dosis entre 1 y 30 mg/kg cada 4 días: línea celular MDAMB435/5T4 (dosificada a 1, 3, 10, y 30 mg/kg), línea celular H1975 (dosificada a 1, 3, y 10 mg/kg) y línea celular 37622A (dosificada a 1 y 10 mg/kg). El modelado de PK/PD se realizó como se ha descrito y las TSC se presentan en la Tabla 17.

Los parámetros de PK/PD de ratón para cada línea celular de xenoinjerto se combinaron con PK humana predicha de A1-mcMMAF para simular dosis necesarias para la eficacia en clínica. Usando esta metodología, A1-mcMMAF tiene una dosis clínica mínimamente eficaz predicha de aproximadamente 0,22 a aproximadamente 2,3 mg/kg Q3 semanas [cada tres semanas] (Tabla 17).

En una realización de la presente invención, los intervalos de dosis pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,18 mg/kg a aproximadamente 2,7 mg/kg, de aproximadamente 0,22 mg/kg a aproximadamente

2,6 mg/kg, de aproximadamente 0,27 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 0,32 mg/kg a aproximadamente 2,3 mg/kg, de aproximadamente 0,37 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, de aproximadamente 0,42 mg/kg a aproximadamente 2,10 mg/kg, de aproximadamente 0,47 mg/kg a aproximadamente 2,05 mg/kg, de aproximadamente 0,52 mg/kg a aproximadamente 2,00 mg/kg, de aproximadamente 0,57 mg/kg a aproximadamente 1,95 mg/kg, de aproximadamente 0,62 mg/kg a aproximadamente 1,90 mg/kg, de aproximadamente 0,67 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, de aproximadamente 0,72 mg/kg a aproximadamente 1,80 mg/kg, de aproximadamente 0,82 mg/kg a aproximadamente 1,70 mg/kg, de aproximadamente 0,92 mg/kg a aproximadamente 1,60 mg/kg, de aproximadamente 1,02 mg/kg a aproximadamente 1,50 mg/kg, de aproximadamente 1,12 mg/kg a aproximadamente 1,40 mg/kg, o de aproximadamente 1,20 mg/kg a aproximadamente 1,30 mg/kg, con dosificación a Q3 semanas. Preferentemente, los intervalos de dosis pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,22 mg/kg a aproximadamente 2,3 mg/kg.

**Ecuación 1**

**1.1**

$$\text{Si } \frac{k_{gEx}}{k_g} w_0 \leq 1, \quad TSC = \frac{k_{gEx} \cdot k_{C50}}{k_{m\acute{a}x} - k_{gEx}}$$

15

**1.2**

$$\text{Si } \frac{k_{gEx}}{k_g} w_0 > 1, \quad TSC = \frac{k_g \cdot k_{C50}}{w_0 \cdot k_{m\acute{a}x} - k_g}$$

**Tabla 17**

Línea celular	TSC [confianza del 80 %] (µg/ml)	Dosis de estasis predicha [confianza del 80 %] (mg/kg Q3 semanas)
MDAMB435/5T4	1,1 [0,9, 1,4]	0,22 [0,18, 0,28]
37622A	5,1 [2,1, 9,9]	1,1 [0,6, 2,0]
H1975	11,6 [9,6, 14,1]	2,3 [2,0, 2,7]

**LISTA DE SECUENCIAS**

20

**SEQ ID NO:1** Cadena pesada de IgG1 humana de A1 humanizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTNFGMNWVRQAPGKGLEWVAVINTNTGEPHYAEAEFKG  
 RFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP  
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ  
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25

ES 2 596 194 T3

**SEQ ID NO:2** Cadena ligera kappa humana de A1 humanizado:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTGVPSTRFSGSG  
YGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDYSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGEC

5 **SEQ ID NO:3** A1-VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNFGMNWVRQAPGKGLEWVAWINTNTGEPHYAEEFKG  
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTLLVTVSS

10 **SEQ ID NO:4** A1-VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTGVPSTRFSGSG  
YGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDYSSPWTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO:5** A1-HC CDR1  
NFGMN

15 **SEQ ID NO:6** A1-HC CDR2  
WINTNTGEPHYAEEFKG

**SEQ ID NO:7** A1-HC CDR3  
WDGAYFFDY

20 **SEQ ID NO:8** A1-LC-CDR1  
KASQSVSNDA

**SEQ ID NO:9** A1-LC-CDR2  
FATNRYT

**SEQ ID NO:10** A1-LC-CDR3  
QQDYSSPWT

25 **SEQ ID NO:11** Antígeno 5T4 Humano

MPGGCSRGPAAAGDGRRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASS  
FSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNR  
NLTEVPTDLPAYVRNLFLLTGNQLAVLPAGAFARRPPLAEL  
AALNLSGSRLDEVVAGAFELPSLRQLDLSHNPLADLSPF  
AFSGSNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSEFGMVV  
AALLAGRALQGLRRLELASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLD  
LSNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLEHLEDNALKVLHNGTLAE  
LQGLPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGKDR  
LTCAYPEKMRNRVLELNSADLDCDPILPPSLQTSYVFLG  
IVLALIGAIFFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYH  
YRYEINADPRLTNLSSNSDV

30 **SEQ ID NO:12** Cadena pesada de IgG4m humana de A1 humanizado:

ES 2 596 194 T3

EVQLVESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGYTFTNFGMNVWRQAPGKGLEWVAVINTNTGEPRYAEEFKG  
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP  
CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK  
TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS  
IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV  
LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:13 VH de IgG4m humana de A1 (A1-IGG4-VH)

EVQLVESGGGLVQPFGGSLRLSCAASGYTFTNFGMNVWRQAPGKGLEWVAVINTNTGEPRYAEEFKG  
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGLVTVSS

5

SEQ ID NO:14 A1-IgG4-VH-CDR1

NFGMN

SEQ ID NO:15 Cadena pesada de A3 quimérico (muA3-hulgG1)

10

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNVWRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSV  
KDRFTISRDDSQSMYLYLQMNNLKTEDTAMYCYVRQWDYDVRAMNYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP  
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL  
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:16 VH de A3 quimérico

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNVWRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSV  
KDRFTISRDDSQSMYLYLQMNNLKTEDTAMYCYVRQWDYDVRAMNYWGQGLVTVSS

15

SEQ ID NO:17 VH-CDR1 de A3 quimérico

TYAMN

SEQ ID NO:18 VH-CDR2 de A3 quimérico

RIRSKSNNYATYYADSVKD

SEQ ID NO:19 VH-CDR3 de A3 quimérico

QWDYDVRAMNY

SEQ ID NO:20 Cadena ligera de A3 quimérico (muA3-huKappa)

20

DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSI TCKASQDVDTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSG  
SGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGEC

25

SEQ ID NO:21 VL A3 quimérico

DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSI TCKASQDVDTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSG  
SGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK

30

**SEQ ID NO:22** VL-CDR1 de A3 quimérico  
KASQDVDTAVA

**SEQ ID NO:23** VL-CDR2 de A3 quimérico  
WASTRLT

5 **SEQ ID NO:24** VL-CDR3 de A3 quimérico  
QQYSSYPYT

**SEQ ID NO:25** Cadena pesada de IgG1 humana de A3 humanizado:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSV  
KDRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRQWDYDVRAMNYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFP  
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL  
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 **SEQ ID NO:26** VH de A3 humanizado:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSV  
KDRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRQWDYDVRAMNYWGQGTLLVTVSS

15 **SEQ ID NO:27** VH-CDR1 de A3 humanizado:  
TYAMN

**SEQ ID NO:28** VH-CDR2 de A3 humanizado:  
RIRSKSNNYATYYADSVKD

20 **SEQ ID NO:29** VH-CDR3 de A3 humanizado:  
QWDYDVRAMNY

**SEQ ID NO:30** Cadena ligera kappa humana de A3 humanizado:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRLTGVPSTRFSGSG  
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGEC

25 **SEQ ID NO:31** VL de A3 humanizado:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRLTGVPSTRFSGSG  
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK

30 **SEQ ID NO:32** VL-CDR1 de A3 humanizado:  
KASQDVDTAVA

**SEQ ID NO:33** VL-CDR2 de A3 humanizado:  
WASTRLT

35 **SEQ ID NO:34** VL-CDR3 de A3 humanizado:  
QQYSSYPYT

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PFIZER GERBER, HANS-PETER

40 <120> CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

<130> PC71762

ES 2 596 194 T3

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> "Secuencia sintética de cadena pesada de IgG1 humana de A1 humanizado

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

15

ES 2 596 194 T3

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

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

ES 2 596 194 T3

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 2  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia sintética de cadena ligera kappa humana de A1 humanizado

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

5

10

ES 2 596 194 T3

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

5 <210> 3  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia sintética de A1-VH  
 <400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 4  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 596 194 T3

<223> Secuencia sintética de A1-VL

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de A1-HC CDR1

15

<400> 5

Asn Phe Gly Met Asn  
1 5

<210> 6

20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Secuencia sintética de A1-HC CDR2

<400> 6

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Ala Glu Glu Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

30

<210> 7

ES 2 596 194 T3

<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia sintética de A1-HC CDR3

<400> 7

**Asp Trp Asp Gly Ala Tyr Phe Phe Asp Tyr**  
**1 5 10**

10 <210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética de A1-LC-CDR1

20 <400> 8

**Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala**  
**1 5 10**

25 <210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia sintética de A1-LC-CDR2

<400> 9

**Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr**  
**1 5**

35 <210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia sintética de A1-LC-CDR3

<400> 10

45 <210> 11  
<211> 420  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

**Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr**  
**1 5**

50 <220>  
<223> Secuencia sintética de antígeno 5T4 humano

55 <400> 11

ES 2 596 194 T3

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu  
1 5 10 15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu  
35 40 45

Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro Ala  
50 55 60

Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg  
65 70 75 80

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn Leu  
85 90 95

Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala  
100 105 110

Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser  
115 120 125

Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu  
130 135 140

Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro Phe  
145 150 155 160

Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu Val  
165 170 175

Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln Asn  
180 185 190

Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Ala  
195 200 205

Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr  
210 215 220

Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asp  
225 230 235 240

ES 2 596 194 T3

Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn  
 245 250 255

Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val  
 260 265 270

Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Ile Arg  
 275 280 285

Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp  
 290 295 300

Met Val Thr Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Asp Arg  
 305 310 315 320

Leu Thr Cys Ala Tyr Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu  
 325 330 335

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu  
 340 345 350

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala  
 355 360 365

Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp  
 370 375 380

Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His  
 385 390 395 400

Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser  
 405 410 415

Asn Ser Asp Val  
 420

<210> 12  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia sintética de cadena pesada de IgG4m humana de A1 humanizado

10

<400> 12

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

ES 2 596 194 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

ES 2 596 194 T3

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de VH de IgG4m humana (A1-IGG4-VH)

<400> 13

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

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

5

10

ES 2 596 194 T3

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 14  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia sintética de A1-IgG4-VH-CDR1  
 <400> 14

Asn Phe Gly Met Asn  
 1 5

15 <210> 15  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia sintética de cadena pesada de A3 quimérico (muA3-hulgG1)  
 <400> 15

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60

25

ES 2 596 194 T3

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn



ES 2 596 194 T3

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

5 <210> 17  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VH-CDR1 de A3 quimérico  
 <400> 17

Thr Tyr Ala Met Asn  
 1 5

15 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VH-CDR2 de A3 quimérico  
 <400> 18

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 1 5 10 15

25 Val Lys Asp

<210> 19  
 <211> 11

# ES 2 596 194 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia sintética de VH-CDR3 de A3 quimérico

<400> 19

**Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr**  
**1 5 10**

10 <210> 20  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética de cadena ligera de A3 quimérico (muA3-huKappa)

20 <400> 20

ES 2 596 194 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 21  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia sintética de VL de A3 quimérico

5

10

ES 2 596 194 T3

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

5 <210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VL-CDR1 de A3 quimérico

<400> 22

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

15 <210> 23  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia sintética de VL-CDR2 de A3 quimérico

25 <400> 23

Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr  
 1 5

30 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VL-CDR3 de A3 quimérico

ES 2 596 194 T3

<400> 24

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

5

<210> 25  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Secuencia sintética de cadena pesada de IgG1 humana de A3 humanizado

<400> 25

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125

15

ES 2 596 194 T3

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

ES 2 596 194 T3

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

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

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 26  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia sintética de VH de A3 humanizado

<400> 26

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5

10

15

ES 2 596 194 T3

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VH-CDR1 de A3 humanizado  
 <400> 27  
 10  
                           **Thr Tyr Ala Met Asn**  
                           1                          5  
 <210> 28  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VH-CDR2 de A3 humanizado  
 20  
 <400> 28  
           **Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser**  
           1                          5                          10                          15  
           **Val Lys Asp**  
 25  
 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VH-CDR3 de A3 humanizado  
 <400> 29  
                           **Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr**  
 35                          1                          5                          10  
 <210> 30  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Secuencia sintética de cadena ligera kappa humana de A3 humanizado  
 45  
 <400> 30  
           **Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly**  
           1                          5                          10                          15  
           **Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala**  
                           20                          25                          30

ES 2 596 194 T3

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 31  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia sintética de VL de A3 humanizado

<400> 31

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

ES 2 596 194 T3

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

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

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

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

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

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

5 <210> 32  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VL-CDR1 de A3 humanizado  
 <400> 32

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

15 <210> 33  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VL-CDR2 de A3 humanizado  
 <400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr  
 1 5

25 <210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia sintética de VL-CDR3 de A3 humanizado  
 <400> 34

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de la fórmula:

Ab-(LU-D)<sub>p</sub>

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en el que;

- 5 (a) Ab es un anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene:
- (i) una región CDR1 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 5,
  - (ii) una región CDR2 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 6, y
  - (iii) una región CDR3 de VH mostrada en la SEQ ID NO: 7;
- 10 (b) LU es una unidad enlazadora seleccionada del grupo que consiste en maleimidocaproilo y maleimidocaproil-Val-Cit-PABA,
- (c) p es un número entero de 1 a 8, y
- (d) D es una unidad de fármaco seleccionada del grupo que consiste en MMAE, MMAD y MMAF.
- 15 2. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena ligera que tiene:
- (a) una región CDR1 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 8,
  - (b) una región CDR2 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 9, y
  - (c) una región CDR3 de VL mostrada en la SEQ ID NO: 10.
- 20 3. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, comprende la región VH de la SEQ ID NO: 3 y la región VL de la SEQ ID NO: 4.
4. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo, consiste en una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2.
- 25 5. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, reconoce un epítipo en el antígeno 5T4 humano, en el que dicho epítipo comprende los restos de aminoácido 173-258 y 282-361 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.
6. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha LU es maleimidocaproilo.
- 30 7. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho fármaco es MMAF.
8. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que p es un número entero de 1 a 4.
9. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que:
- 35 (a) dicho anticuerpo anti-5T4 consiste en una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2,
- (b) dicha LU es maleimidocaproilo,
- (c) dicho fármaco es MMAF, y
- (d) p es un número entero de 1 a 8.
- 40 10. El conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que:
- (a) dicho anticuerpo anti-5T4 consiste en una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 2,
  - (b) dicha LU es maleimidocaproilo,
  - (c) dicho fármaco es MMAF, y
  - (d) p es un número entero de 1 a 4.
- 45 11. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. El conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso como medicamento.

13. El conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de un cáncer 5T4 positivo.
- 5 14. El conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma colorrectal, de mama, pancreático y pulmonar no microcítico.
15. Un procedimiento para producir un conjugado de anticuerpo anti-5T4-fármaco que comprende:
- 10 (a) unir químicamente una unidad enlazadora seleccionada del grupo que consiste en maleimidocaproílo o maleimidocaproil-Val-Cit-PABA a una unidad de fármaco seleccionada del grupo que consiste en MMAE, MMAD, o MMAF;
- (b) conjugar dicho enlazador-fármaco al anticuerpo anti-5T4 o parte de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y;
- (c) purificar el conjugado de anticuerpo-fármaco.