

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 801**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2001 E 14189442 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2857516**

54 Título: **Anticuerpos multivalentes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

11.04.2000 US 195819 P

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

17.10.2017

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
One DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**MILLER, KATHY L. y
PRESTA, LEONARD G.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 637 801 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos multivalentes y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a anticuerpos modificados por ingeniería genética, con cuatro o más sitios de uniones a antígeno funcionales, y a usos, tales como usos terapéuticos, para dichos anticuerpos modificados por ingeniería genética.

Descripción de la técnica relacionada15 **Estructura de los anticuerpos de origen natural**

Los anticuerpos de origen natural (inmunoglobulinas) comprenden dos cadenas pesadas unidas entre sí mediante enlaces disulfuro y dos cadenas ligeras, estando una cadena ligera unida a cada una de las cadenas pesadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (VH) seguido de diversos dominios constantes (tres o cuatro dominios constantes, CH1, CH2, CH3 y CH4, dependiendo de la clase de anticuerpo). Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante (CL) en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Véase la Fig. 1 del presente documento. Se piensa que los restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada, véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 186: 651-663 (1985); y Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4592-4596 (1985).

Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión del anticuerpo con un antígeno, pero están implicados en diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Los dominios variables de cada par de cadenas ligera y pesada están directamente implicados en la unión del anticuerpo con el antígeno. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de origen natural tienen la misma estructura general, comprendiendo cada uno de ellos cuatro regiones marco conservadas (FR, *framework regions*), cuyas secuencias están algo conservadas, conectados por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)). Las cuatro FR adoptan en gran medida una conformación de lámina beta y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se sujetan en estrecha proximidad gracias a las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno.

40 Las Figuras 2A-E del presente documento representan las estructuras de los cinco isotipos de inmunoglobulinas principales de origen natural. Las inmunoglobulinas IgG, IgD e IgE poseen solamente dos sitios de unión a antígeno. Por otro lado, la IgA y la IgM son capaces de formar estructuras poliméricas con valencias superiores.

45 Las células plasmáticas secretan IgM como un pentámero en el que cinco unidades monoméricas se sujetan entre sí mediante enlaces disulfuro que unen sus dominios carboxilo terminal (C μ 4/C μ 4) y dominios C μ 3/C μ 3. Las cinco subunidades monoméricas se disponen con tres regiones Fc en el centro del pentámero y los 10 sitios de unión a antígeno en la periferia de la molécula. Cada pentámero contiene un polipéptido ligado a Fc adicional denominado cadena (de unión) J, que está unida por puentes disulfuro al resto de cisteína carboxilo terminal de dos de las cadenas de 10 μ . La cadena J parece que es necesaria para la polimerización de los monómeros para formar la IgM pentamérica, esta se añade justo antes de la secreción del pentámero. Una molécula de IgM puede unir 10 moléculas de hapteno pequeñas; sin embargo, debido al impedimento estérico, solamente 5 moléculas de antígenos más grandes pueden unirse simultáneamente. El aumento de la valencia de la IgM pentamérica aumenta su capacidad para unir dichos antígenos multidimensionales como partículas virales y glóbulos rojos (RBC, *Red Blood Cells*).

La IgA existe principalmente como un monómero, aunque algunas veces se observan formas poliméricas, tales como dímeros, trímeros e incluso tetrámeros. La IgA de secreciones externas consta de un dímero o tetrámero, de un polipéptido de cadena J, y de una cadena polipeptídica denominada componente secretor.

60 **Anticuerpos para usos clínicos**

Se ha dado un amplio uso a los anticuerpos monoclonales, particularmente a los derivados de roedores, incluyendo ratones, sin embargo, son frecuentemente antigénicos en el uso clínico humano. Por ejemplo, una limitación principal en el uso clínico de anticuerpos monoclonales de roedores es una respuesta antiglobulina durante la terapia (Miller *et al.*, Blood 62: 988-995 (1983); y Schroff, R. W. *et al.*, Cancer Res. 45: 879-885 (1985)).

- La técnica ha intentado superar este problema construyendo anticuerpos “quiméricos” en los que un dominio variable de unión a antígeno animal está acoplado a un dominio constante humano (Cabilly *et al.*, la patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne *et al.*, Nature 312: 643-646 (1984); y Neuberger *et al.*, Nature 314: 268-270 (1985)). El isotipo del dominio constante humano puede seleccionarse para adaptar el anticuerpo quimérico para la participación en la CCDA y en la CDC (véase, por ejemplo, Brüggemann *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988); Love *et al.*, Methods in Enzymology 178: 515-527 (1989); y Bindon *et al.*, J. Exp. Med. 168: 127-142 (1988)). En la realización típica, dichos anticuerpos quiméricos contienen aproximadamente un tercio de las secuencias de roedores (o de otras especies no humanas) y por tanto son capaces de suscitar una respuesta anti-globulina significativa en seres humanos. Por ejemplo, en el caso del anticuerpo anti-CD3 murino, OKT3, gran parte de la respuesta anti-globulina resultante se dirige contra la región variable en lugar de contra la región constante (Jaffers *et al.*, Transplantation 41: 572-578 (1986)).
- En un esfuerzo adicional para resolver las funciones de unión a antígeno de los anticuerpos y para minimizar el uso de secuencias heterólogas en anticuerpos humanos, Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988); y Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988)) han sustituido las CDR o las secuencias de las CDR de roedores por los segmentos correspondientes de un anticuerpo humano.
- La promesa terapéutica de esta estrategia se basa en la eficacia clínica de un anticuerpo humanizado específico para el antígeno CAMPATH-1 con dos pacientes de linfoma no Hodgkin, uno de los cuales había desarrollado previamente una respuesta anti globulina contra el anticuerpo de rata parental (Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988); y Hale *et al.*, Lancet i: 1394-1399 (1988)).
- En algunos casos, la sustitución de las CDR de anticuerpos de roedores por las CDR humanas en regiones marco conservadas humanas es suficiente para transferir una alta afinidad de unión a antígeno (Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988)), mientras que en otros casos ha sido necesario reemplazar adicionalmente uno (Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988)) o varios (Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989)) restos marco conservados. Véase también Co *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2869-2873 (1991); la Patente de Estados Unidos Nº 5.821.337 (Carter *et al.*); y la Patente de Estados Unidos Nº 5.530.101 (Queen *et al.*). Otras referencias relacionadas con la humanización de anticuerpos incluyen Gorman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185 (1991); Daugherty *et al.*, Nucleic Acids Research 19(9): 2471-2476 (1991); Brown *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2663-2667 (1991); y Junghans *et al.*, Cancer Research 50: 1495-1502 (1990).
- En lugar de con un anticuerpo quimérico/humanizado, a un paciente se le puede tratar con un anticuerpo humano para impedir que se susciten anticuerpos humanos contra un anticuerpo murino (lo que se conoce como “respuesta HAMA”). Se dispone de diversas tecnologías para generar anticuerpos humanos.
- Los anticuerpos humanos pueden seleccionarse usando tecnología de presentación de fagos. La presentación de fagos se ha adaptado para seleccionar anticuerpos humanos de un donante inmunizado (Marks *et al.* J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)). De acuerdo con esta estrategia, se usa la PCR para amplificar genes de dominio variable a partir de ARNm preparado de linfocitos de sangre periférica (LSP) humana. Se usan cebadores de tal manera que se amplifica el ADN de las cadenas pesadas tanto de IgG como de IgM y las cadenas tanto κ como λ . Después, estos genes se combinan al azar y se expresan como un Fv monocatenario (scFv, *single chain Fv*) fusionado a la proteína de recubrimiento del gen III del fago M13. Después, los anticuerpos humanos contra un antígeno de interés pueden identificarse por rondas de crecimiento y selección mediante la unión con ese antígeno (por ejemplo, con el antígeno inmovilizado). Véase Griffiths *et al.* EMBO J. 12: 725-734 (1993).
- También se han construido repertorios de anticuerpos-fagos “sintéticos” a partir de segmentos génicos VH humanos. En primer lugar se construyó un repertorio (2×10^7 clones) usando un bucle H3 corto de cinco u ocho restos al azar cada uno con 49 segmentos y combinados con una cadena ligera fija (Hoogenboom *et al.* J. Mol. Biol. 227: 381-388 (1992)). Añadiendo una serie de bucles H3 de diferentes longitudes, hasta 12 restos, se creó una sola biblioteca a partir de la cual pudo seleccionarse una serie de más de 20 especificidades de unión (Winter *et al.* Ann. Rev. Immuno. 12: 433-55 (1994)). A partir de la región marco conservada de un solo anticuerpo se han construido otras bibliotecas sintéticas distribuyendo al azar las CDR del anticuerpo humano (Garrard y Henner Gene 128: 103-109 (1993)). En el presente documento, los anticuerpos que se obtienen a partir de dichos repertorios de fago-anticuerpo sintéticos también se considera que son anticuerpos “humanos”.
- La afinidad de los fagos-anticuerpos “primarios” de baja afinidad puede mejorarse usando tecnología de presentación de fagos. Una estrategia es usar una estrategia de redistribución de cadenas en la que el dominio VH se mantiene constante y después se recombina con la biblioteca original de los genes de VL y agentes de unión más fuertes seleccionados por unión a antígeno inmovilizado. Este ciclo se repite fijando el nuevo dominio VL y recombinando con la biblioteca de VH original (Marks *et al.* Bio/Technology 10: 779-783 (1992)). Como alternativa, en el anticuerpo primario pueden introducirse mutaciones puntuales usando PCR propensa a error y agentes de unión de mayor afinidad seleccionados usando presentación de fagos. Gram *et al.* PNAS (USA) 89: 3576-3580

(1992).

También pueden producirse anticuerpos humanos inmunizando ratones que se han modificado por ingeniería genética para expresar anticuerpos humanos. Los ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés, *severe combined immune deficient*) no pueden producir sus propias inmunoglobulinas debido a un defecto en el gen de la recombinasa. Diversos grupos han reconstituido un sistema inmunitario humoral funcional en estos ratones mediante la transferencia de linfocitos de sangre periférica (LSP) humana. Estos ratones LSP-hu-SCID pueden usarse para suscitar anticuerpos humanos después de la inmunización con antígenos. Duchosal *et al.* Nature 355: 258-262 (1992). Usando otra estrategia, los genes de la cadena pesada y ligera en los ratones se desactivan y después se introducen en los ratones cromosomas artificiales de levadura (YAC, *yeast artificial chromosomes*) modificados por ingeniería genética con secuencias de ADN de gran tamaño que contienen genes humanos de la cadena pesada y ligera. Dichos "XenoRatones" pueden producir anticuerpos humanos después de la inmunización con un antígeno de interés. Véanse las Patentes de Estados Unidos Nos 5.434.340; 5.591.699; 5.569.825; 5.545.806; y 5.545.807.

También pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos inmortalizando un linfocito B humano que produce un anticuerpo de interés. Los problemas éticos en cuanto la inmunización en seres humanos para generar linfocitos B humanos activados pueden evitarse inmunizando linfocitos humanos *in vitro*. Tanto los LSP humana (Borrebäck *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3995-4000 (1988)) como los esplenocitos humanos (Boerner *et al.* J. Immunol. 147, 86-95 (1991)) se han inmunizado satisfactoriamente *in vitro*. Se han conseguido mejoras en la tecnología del hibridoma humano usando un heterohíbrido de ratón-ser humano como compañero de fusión (Boerner *et al.*).

Variantes de anticuerpos

Los anticuerpos se han modificado para aumentar su valencia de unión a antígeno. Por ejemplo, Ghetie *et al.*, homodimerizaron anticuerpos monoclonales reactivos contra tumores (anticuerpos anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD22 y anti-HER2) introduciendo químicamente un enlace tioéter entre un par de IgG usando dos agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales. Ghetie *et al.* PNAS (USA) 94: 7509-7514 (1997); y WO 99/02567. Wolff *et al.* Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) también unieron químicamente un anticuerpo monoclonal de IgG (CHiBR96) usando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales para generar un homodímero de anticuerpo monoclonal con actividad antitumoral potenciada en ratones desnudos.

Shopes *et al.* reemplazaron un resto de serina cerca del extremo carboxilo de una cadena pesada de IgG1 humana (Ser⁴⁴⁴) con una cisteína. Los enlaces disulfuro intermoleculares introducidos entre los restos de Cys⁴⁴⁴ unieron pares de inmunoglobulinas "cola-con-cola" para formar dímeros covalentes (H₂L₂)₂. Se dice que los dímeros anti-dansilo son más eficaces que la IgG1 humana monomérica en la citólisis mediada por complemento dependiente de anticuerpo de eritrocitos portadores de haptenos. Shopes, B. J. Immunol. 148(9): 2918-2922 (1992); y documento WO 91/19515. Este enfoque, que implica la introducción de restos de cisteína, también se ha usado para generar una forma homodimérica del anticuerpo CAMPATH-1 H. El anticuerpo CAMPATH-1 H homodimérico presentó lisis mejorada usando células diana que expresaban antígenos a baja densidad, pero no se observó mejora en la lisis usando células que expresaban el antígeno a alta densidad. Greenwood *et al.* Ther. Immunol. 1: 247-255 (1994). Véase también, Caron *et al.* J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992), en lo que respecta a un anticuerpo anti-CD33 modificado por ingeniería genética con una sustitución de serina por cisteína en la posición 444 de la cadena pesada lo que permite la formación de un enlace disulfuro intercatenario en el extremo COOH de la IgG. Se dice que la IgG homodimérica tiene una avidéz similar a la de la IgG parental, pero aparentemente mostró una capacidad mejorada para internalizar y retener radioisótopos en células de leucemia diana y fue más fuerte en la destrucción de células de leucemia mediada por complemento y en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos usando células efectoras humanas.

Coloma y Morrison Nature Biotech. 15: 159-163 (1997) describen un anticuerpo biespecífico tetravalente que se modificó por ingeniería genética fusionando ADN que codificaba un anticuerpo anti-dansilo monocatenario Fv (scFv) después del extremo C (CH3-scFv) o después de la región bisagra (Bisagra-scFv) de un anticuerpo anti-dansilo de IgG3. Véase, además, el documento WO95/09917. Smith y Morrison modificaron por ingeniería genética tres versiones de IgG3 similares a mu modificando por ingeniería genética (1) el resto de Cys414 de una cadena pesada de IgM o (2) un resto de Cys575 de una cadena pesada de IgM, o tanto (1) como (2), en el gen de la cadena pesada de IgG3. Las tres construcciones mutantes se expresaron en células Sp2/0 y se ensamblaron en polímeros que contenían hasta seis subunidades H₂L₂. Se consideró que los polímeros de IgG "similares a IgM" producidos de esta manera, poseían las propiedades tanto de unión al receptor de Fc gamma de la IgG como la actividad del complemento más fuerte de la IgM. Véase, Smith y Morrison Bio/Technology 12: 683-688 (1994).

Shuford y colaboradores aislaron un oligómero de anticuerpo anti-estreptococo del grupo B de IgG1 humana de una línea celular de mieloma transfectada. Shuford *et al.* Science 252: 724-727 (1991). Análisis inmunoquímicos y de secuenciación de ADN indicaron que la línea celular produjo tanto una cadena ligera kappa normal como una cadena ligera variante V-V-V de 37 kD (L37). La cotransfección de vectores que codificaban la cadena pesada y L37 dieron como resultado la producción de IgG oligomérica.

La Patente de Estados Unidos N° 5.641.870 (Rinderknecht *et al.*) describe un fragmento F(ab')₂ lineal, bivalente que comprende repeticiones en tándem de un fragmento de cadena pesada (VH-CH1-VH-CH1), cosecretado con una cadena ligera. El extremo C de CH1 se unió dirigido al extremo N de VH sin ninguna secuencia de proteína de ligamiento extraña.

5 Alt y colaboradores describen moléculas similares a IgG de diacuerpos monocatenarios (scDb, *single-chain diabody*) diméricos que, en un solo polipéptido, incluyen dos dominios VH, dos dominios VL, un dominio CH2 opcional, y un dominio CH3 en el siguiente orden VHA-VLB-VHB-VLA-(CH2)-CH3. Alt *et al.*, FEBS Letters, 454: 90-94 (1990). Se afirma que la fusión de los scDb con una región Fc o una región CH3 da como resultado la expresión de moléculas
10 similares a IgG diméricas funcionalmente activas (Resumen).

Otras publicaciones sobre variantes de anticuerpos incluyen el documento WO 00/06605; las Patentes de Estados Unidos Nos 5.591.828; 5.959.083; 6.027.725; los documentos WO98/58965 y WO94/13804; Tutt *et al.* J. Immunol. 147:60-69 (1991); el documento WO99/37791; la Patente de Estados Unidos N° 5.989.830; los documentos
15 WO94/15642; EP 628.078B1; WO97/14719; Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Pluckthun *et al.*, Immunotechnology, Volumen 3, n.º 2, páginas 83-105, 1997 resume enfoques de ingeniería proteica para fragmentos de anticuerpos multivalentes y biespecíficos. El documento EP0.517.024 describe la preparación y el uso de receptores biespecíficos tetravalentes.

20 **Tirosina quinasas receptoras de ErbBb**

Las tirosina quinasas receptoras de ErbB son mediadoras importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye al menos cuatro miembros diferentes que incluyen el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR o ErbB1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

El EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado causalmente en formación de tumores malignos humanos. En particular, se ha observado expresión aumentada del EGFR en cáncer de mama, de vejiga, de pulmón, de cabeza, de cuello y de estómago, así como en glioblastomas. La expresión aumentada del receptor EGFR se asocia a menudo con producción aumentada del ligando del EGFR. El Factor alfa de Crecimiento Transformante (TGF-alfa), mediante las mismas células tumorales, da como resultado la activación de receptores mediante una ruta estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn Pharmac. Ther. 64: 127-154 (1994). Se han evaluado anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR o sus ligandos, TGF-alfa y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichos tumores malignos. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn., citado anteriormente; Masui *et al.* Cancer Research 44: 1002-1007 (1984); y Wu *et al.* J. Clin. Invest. 95: 1897-1905 (1995).

El segundo miembro de la familia ErbB, p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas químicamente tratadas. La forma activada del protooncogén *neu* se obtiene de una mutación puntual (valina por ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en cánceres de mama y ovario y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon *et al.*, Science, 235: 177-182 (1987); Slamon *et al.*, Science, 244: 707-712 (1989); y Patente de Estados Unidos N° 4.968.603). Hasta ahora, no se ha descrito ninguna mutación puntual análoga a la del protooncogén *neu* para tumores humanos. La sobreexpresión de HER2 (frecuentemente pero no uniformemente debida a la amplificación génica) también se ha observado en otros carcinomas, incluyendo carcinomas de estómago, endometrio, glándulas salivares, pulmón, riñón, colon, tiroide, páncreas y vejiga.

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos de la proteína p185^{neu} de rata y HER2 de ser humano. Drebin y colaboradores han suscitado anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin *et al.*, Cell 41: 695-706 (1985); Myers *et al.*, Meth. Enzym. 198: 277-290 (1991); documento WO94/22478. Drebin *et al.* Oncogene 2: 273-277 (1988) indican que, mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185^{neu} producen un efecto antitumoral sinérgico en células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones desnudos. Véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.824.311 expedida el 20 de octubre de 1998.

Hudziak *et al.*, Mol. Cell. Biol. 9(3): 1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos anti-HER2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor mamario humano SKBR3. La proliferación celular relativa de las células SKBR3 después de exposición a los anticuerpos se determinó por tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo inhibición máxima con el anticuerpo denominado 4D5 que inhibió la proliferación celular al 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular a un menor grado en este ensayo. Posteriormente se descubrió que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba líneas celulares de tumor de mama que sobreexpresaban HER2, contra los efectos citotóxicos del TNF-alfa. Véase, también, la Patente de Estados Unidos N° 5.677.171, expedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos anti-HER2 analizados en Hudziak *et al.*, se caracterizaron adicionalmente en Fendly *et al.*, Cancer Research 50: 1550-1558 (1990); Kotts *et al.*, In Vitro 26(3): 59A (1990); Sarup *et al.*, Growth Regulation 1: 72-82 (1991); Shepard *et al.*, J. Clin. Immunol. 11 (3): 117-127 (1991); Kumar *et al.* Mol. Cell. Biol. 11 (2): 979-986 (1991); Lewis *et al.* Cancer Immunol. Immunother.

37: 255-263 (1993); Pietras *et al.* Oncogene 9: 1829-1838 (1994); Vitetta *et al.* Cancer Research 54: 5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.* J. Biol. Chem. 269(20): 14661-14665 (1994); Scott *et al.* J. Biol. Chem. 266: 14300-5 (1991); D'souza *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7202-7206 (1994); Lewis *et al.* Cancer Research 56: 1457-1465 (1996); y Schaefer *et al.* Oncogene 15: 1385-1394 (1997).

5 Una versión de IgG1 humanizada recombinante del anticuerpo anti-HER2 murino, 4D5 (rhumMAb HER2 o HERCEPTIN®; disponible en el comercio de Genentech, Inc., South San Francisco) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan HER2 que han recibido terapia previa prolongada contra el cáncer (Baselga *et al.*, J. Clin. Oncol. 14: 737-744 (1996)). La Food and Drug Administration aprobó la comercialización de HERCEPTIN® el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con
10 cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2.

En Tagliabue *et al.* Int. J. Cancer 47: 933-937 (1991); McKenzie *et al.* Oncogene 4: 543-548 (1989); Maier *et al.* Cancer Res. 51: 5361-5369 (1991); Bacus *et al.* Molecular Carcinogenesis 3: 350-362 (1990); Stancovski *et al.* PNAS (USA) 88: 8691-8695 (1991); Bacus *et al.* Cancer Research 52: 2580-2589 (1992); Xu *et al.* Int. J. Cancer 53: 401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk *et al.* Cancer Research 52: 2771-2776 (1992); Hancock *et al.* Cancer Res. 51: 4575-4580 (1991); Shawver *et al.* Cancer Res. 54: 1367-1373 (1994); Arteaga *et al.* Cancer Res. 54: 3758-3765 (1994); Harwerth *et al.* J. Biol. Chem. 267: 15160-15167 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5783.186; Klapper *et al.* Oncogene 14: 2099-2109 (1997); documento WO 98/77797; y Patente de Estados Unidos N° 5.783.186, se han escrito otros anticuerpos anti-HER2 con diversas propiedades. La exploración de la homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores de ErbB; HER3 (Patentes de Estados Unidos Nos 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus *et al.* PNAS (USA) 86: 9193-9197 (1989)) y HER4 (Solicitud de Patente EP N° 599.274; Plowman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, Nature, 366: 473-475 (1993)). Estos dos receptores presentan expresión aumentada en al menos
25 algunas líneas de células de cáncer de mama.

Se encontraron receptores de ErbB generalmente en células en diversas combinaciones y se piensa que la heterodimerización aumenta la diversidad de respuestas celulares contra diversos ligandos de ErbB (Earp *et al.* Breast Cancer Research and Treatment 35: 115-132 (1995)). El EGFR está unido por seis ligandos diferentes; el
30 Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor alfa de Crecimiento Transformante (TGF-alfa), la anfirregulina, el Factor de Crecimiento Epidérmico Ligado a Heparina (HB-EGF), la betacelulina y la epirregulina (Groenen *et al.* Growth Factors 11: 235-257 (1994)). Una familia de proteínas de herregulina resultante del corte y empalme alternativo de un solo gen son ligandos para HER3 y HER4. La familia de herregulina incluye herregulinas alfa, beta y gamma (Holmes *et al.*, Science, 256: 1205-1210 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.641.869; y Schaefer *et al.* Oncogene 15: 1385-1394 (1997)); factores de diferenciación de neu (NDF), factores de crecimiento glial (GGF); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF). Para una revisión, véase Groenen *et al.* Growth Factors 11: 235-257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7: 247-262 (1996) y Lee *et al.* Pharm. Rev. 47: 51-85 (1995). Recientemente, se identificaron dos ligandos ErbB
35 adicionales; la neurregulina-2 (NRG-2) que se informa que se une bien a HER3 o a HER4 (Chang *et al.* Nature 387 509-512 (1997); y Carraway *et al.* Nature 387: 512-516 (1997)) y la neurregulina-3 que se une a HER4 (Zhang *et al.* PNAS (USA) 94(18): 9562-7 (1997)). El HB-EGF, la betacelulina y la epirregulina también se unen a HER4.

Aunque el EGF y el TGF-alfa no se unen a HER2, el EGF estimula a EGFR y a HER2 para formar un heterodímero, que activa a EGFR y da como resultado la transfosforilación de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o
45 transfosforilación parece activar a la tirosina quinasa HER2. Véase Earp *et al.*, citado anteriormente. Del mismo modo, cuando HER3 se coexpresa con HER2, se forma un complejo de señalización activo y anticuerpos dirigidos contra HER2 pueden alterar este complejo (Sliwkowski *et al.*, J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de HER3 por la herregulina (HRG) aumenta a un estado de mayor afinidad cuando se coexpresa con HER2. Véase también, Levi *et al.*, Journal of Neuroscience 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435 (1995); y Lewis *et al.*, Cancer Res., 56: 1457-1465 (1996) con respecto al
50 complejo HER2-HER3 proteína. Al igual que HER3, HER4, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, Cell 78: 5-8 (1994)).

55 **Superfamilia de receptores de TNF**

Diversas moléculas, tales como el Factor alfa de Necrosis Tumoral ("TNF-alfa"), el Factor beta de Necrosis Tumoral ("TNF-beta"), la Linfotoxina alfa ("LT-alfa"), el ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1 BB, ligando Apo-1 (denominado también ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (denominado también TRAIL), ligando Apo-3 (denominado también TWEAK), la osteoprotegerina (OPG), APRIL, el ligando RANK (denominado también TRANCE) y TALL-1 (denominado también BlyS, BAFF o THANK) se han identificado como miembros de la familia de citocinas del Factor de Necrosis Tumoral ("TNF") (Véase, por ejemplo Gruss y Dower, Blood, 85: 3378-3404 (1995); Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271: 12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, Immunity, 3: 673-682 (1995); Browning *et al.*, Cell, 72: 847-856 (1993); Armitage *et al.* Nature, 357: 80-82 (1992); documento WO 97/01633 publicado el 16 de enero de 1997; documento WO 97/25428 publicado el 17 de julio de 1997; Marsters *et al.*, Curr. Biol., 8: 525-528 (1998); Simonet *et al.*, Cell, 89: 309-319 (1997); Chicheportiche *et al.*, Biol. Chem., 272: 32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, J. Exp. Med., 188: 1185-1190 (1998); documento WO98/28426 publicado el 2 de
65

- julio de 1998; documento WO98/46751 publicado el 22 de octubre de 1998; documento WO/98/18921 publicado el 7 de mayo de 1998; Moore *et al.*, *Science*, 285: 260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65: 680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189: 1747-1756 (1999); y Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274: 15978-15981 (1999). Entre estas moléculas, se ha descrito que el TNF-alfa, el TNF-beta, el ligando CD30, ligando 4-1 BB, ligando Apo-1, ligando Apo-2 (Apo2L/TRAIL) y ligando Apo-3 (TWEAK) están implicados en la muerte celular apoptótica. Se ha descrito que tanto el TNF-alfa como el TNF-beta inducen la muerte apoptótica en células tumorales susceptibles (Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17: 689 (1987)).
- Diversas moléculas en la familia de TNF también tienen uno o más papeles significativos en la función o desarrollo del sistema inmunitario (Gruss *et al.*, *Blood*, 85: 3378 (1995)). Zheng *et al.* han descrito que el TNF-alfa está implicado en la apoptosis posterior a estimulación de linfocitos T positivos a CD8 (Zheng *et al.*, *Nature*, 377: 348-351 (1995)). Otros investigadores han descrito que el ligando CD30 puede estar implicado en la delección de linfocitos T autoreactivos en el timo (Amakawa *et al.*, *Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, Abstr. No. 10, (1995)). El ligando CD40 activa muchas funciones de linfocitos B, incluyendo proliferación, secreción de inmunoglobulina, y supervivencia (Renshaw *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180: 1889 (1994)). Se ha descrito que, otra citocina de la familia de TNF, identificada recientemente, TALL-1 (BlyS), en determinadas condiciones, induce la proliferación de linfocitos B y la secreción de inmunoglobulina (Moore *et al.*, citado anteriormente; Schneider *et al.*, citado anteriormente; Mackay *et al.*, *J. Exp. Med.*, 190: 1697 (1999)).
- Se han asociado mutaciones en los genes de ligandos o receptores de Fas/Apo-1 de ratón (denominados *lpr* y *gld*, respectivamente) con algunos trastornos autoinmunitarios, lo que indica que el ligando Apo-1 puede desempeñar un papel en la regulación de la delección clonal de linfocitos autorreactivos en la periferia (Krammer *et al.*, *Curr. Op. Immunol.*, 6: 279-289 (1994); Nagata *et al.*, *Science*, 267: 1449-1456 (1995)). También se indica que el ligando Apo-1 induce apoptosis posterior a estimulación en linfocitos T y en linfocitos B positivos a CD4, y puede estar implicado en la eliminación de linfocitos activados cuando su función ya no es necesaria (Krammer *et al.*, citado anteriormente; Nagata *et al.*, citado anteriormente). Se han descrito anticuerpos monoclonales de ratón agonistas que se unen específicamente al receptor de Apo-1 que presentan actividad de destrucción celular que es comparable a o similar a la del TNF-alfa (Yonehara *et al.*, *J. Exp. Med.*, 169: 1747-1756 (1989)).
- Se piensa que la inducción de diversas respuestas celulares mediadas por dichas citocinas de la familia del TNF se inicia a través de su unión a receptores celulares específicos. Previamente, se identificaron dos receptores de TNF distintos de aproximadamente 55 kDa (TNFR1) y 75 kDa (TNFR2) (Hohman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264: 14927-14934 (1989); Brockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 3127-3131 (1990); documento EP 417.563, publicado el 20 de marzo de 1991; Loetscher *et al.*, *Cell*, 61: 351 (1990); Schall *et al.*, *Cell*, 61: 361 (1990); Smith *et al.*, *Science*, 248: 1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 3020-3026 (1991)). Se descubrió que aquellos TNFR compartían la estructura típica de los receptores de la superficie celular, incluyendo las regiones extracelulares, transmembrana e intracelulares. Las partes extracelulares de ambos receptores se descubrieron de manera natural también como proteínas de unión a TNF solubles (Nophar *et al.*, *EMBO J.*, 9: 3269 (1990); y Kohno *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 8331 (1990); Hale *et al.*, *J. Cell. Biochem. Supplement* 15F, 1991, p. 113 (P424)).
- La parte extracelular de los TNFR de tipo 1 y tipo 1 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón de secuencias de aminoácidos repetitivo de cuatro dominios ricos en cisteína (DRC) denominados de 1 a 4, comenzando desde el extremo NH₂. (Schall *et al.*, citado anteriormente; Loetscher *et al.*, citado anteriormente; Smith *et al.*, citado anteriormente; Nophar *et al.*, citado anteriormente; Kohno *et al.*, citado anteriormente; Banner *et al.*, *Cell*, 73: 431-435 (1993)). En diversas otras proteínas de superficie celular existe un patrón repetitivo similar de DRC, incluyendo el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) p75 (Johnson *et al.*, *Cell*, 47: 545 (1986); Radeke *et al.*, *Nature*, 325: 593 (1987)), el antígeno de linfocitos B CD40 (Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.*, 8: 1403 (1989)), el antígeno OX40 de linfocitos T (Mallet *et al.*, *EMBO J.*, 9: 1063 (1990)) y el antígeno Fas (Yonehara *et al.*, citado anteriormente e Itoh *et al.*, *Cell*, 66: 233-243 (1991)). Los DRC también se encuentran en las proteínas T2 similares a TNFR solubles (sTNFR) de los poxvirus de Shope y mixoma (Upton *et al.*, *Virology*, 160: 20-29 (1987); Smith *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 335 (1991); Upton *et al.*, *Virology*, 184: 370 (1991)). Los alineamientos óptimos de estas secuencias indican que las posiciones de los restos de cisteína están bien conservadas. Algunas veces, se hace referencia a estos receptores, en su conjunto, como miembros de la superfamilia de receptores de TNF/NGF.
- Los ligandos de la familia de TNF identificados hasta ahora, con la excepción de la Linfotóxina alfa, son proteínas transmembrana de tipo II, cuyo extremo C es extracelular. En cambio, la mayor parte de los receptores de la familia de receptores de TNF (TNFR) identificados hasta ahora, son proteínas transmembranas de tipo I. Sin embargo, tanto en las familias de receptores como de ligandos de TNF, la homología identificada entre miembros de la familia se ha encontrado principalmente en el dominio extracelular ("DEC"). Varias citocinas de la familia de TNF, incluyendo el TNF alfa, el ligando Apo-1 y el ligando CD40, se escinden proteolíticamente en la superficie celular; formando normalmente en cada caso la proteína resultante una molécula homotrimérica que funciona como una citocina soluble. Normalmente, las proteínas de la familia de receptores de TNF también se escinden proteolíticamente para liberar los DEC de receptores solubles que pueden funcionar como inhibidores de las

citocinas afines.

- Más recientemente, se han identificado otros miembros de la familia de TNFR. En von Bulow *et al.*, *Science*, 278: 138-141 (1997), los investigadores describen un receptor de la membrana plasmática denominado Activador Transmembrana e Interactor de CAML o "TACI". Se describe que el receptor de TACI contiene un motivo rico en cisteína característico de la familia de TNFR. En un ensayo *in vitro*, el entrecruzamiento de TACI en la superficie de células Jurkat transfectadas con anticuerpos específicos de TACI conduce a la activación de NF-KB (véase también el documento WO 98/39361 publicado el 18 de septiembre de 1998).
- Laabi *et al.*, *EMBO J.*, 11: 3897-3904 (1992) describieron la identificación de un nuevo gen denominado "BCM" cuya expresión se descubrió que coincidía con la maduración terminal de linfocitos B. La fase de lectura abierta del ADNc normal de BCM predijo un polipéptido de una longitud de 184 aminoácidos con un solo dominio transmembrana. Estos investigadores denominaron más tarde a este gen "BCMA." (Laabi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 22: 1147-1154 (1994)). Se indicó que la expresión del ARNm de BCMA estaba ausente en líneas de linfocitos B tumorales humanos que representan la fase pro-B linfocitaria, y por tanto, se piensa que está relacionada con la fase de diferenciación de linfocitos (Gras *et al.*, *Int. Immunology*, 7: 1093-1106 (1995)). En Madry *et al.*, *Int. Immunology*, 10: 1693-1702 (1998), se describió la clonación del ADNc del BCMA a murino. Se indica que el ADNc del BCMA murino codifica un polipéptido de una longitud de 185 aminoácidos que tiene una identidad del 62 % con el polipéptido BCMA humano. El alineamiento de las secuencias de proteína BCMA murina y humana reveló un motivo conservado de seis cisteínas en la región N terminal, lo que sugiere que la proteína BCMA pertenece a la superfamilia de TNFR (Madry *et al.*, citado anteriormente).
- En Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 6: 750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa de longitud completa, denominado Apo-3, que presenta similitud con la familia de TNFR en sus repeticiones ricas en cisteína extracelulares y se asemeja a TNFR1 y CD95 en que contiene una secuencia de dominio citoplasmático de muerte (véase también Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 6: 1669 (1996)). Otros investigadores también se han referido a Apo-3 como DR3, wsl-1, TRAMP y LARD (Chinnaiyan *et al.*, *Science*, 274: 990 (1996); Kitson *et al.*, *Nature*, 384: 372 (1996); Bodmer *et al.*, *Immunity*, 6: 79 (1997); Sreaton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 4615-4619 (1997)).
- Pan *et al.* han desvelado otro miembro de la familia de receptores de TNF denominado "DR4" (Pan *et al.*, *Science*, 276: 111-113 (1997); véase también el documento WO98/32856 publicado el 30 de julio de 1998). Se indicó que DR4 contenía un dominio citoplasmático de muerte que puede estimular el aparato suicida celular. Pan *et al.* desvelan que se piensa que el DR4 es un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL.
- En Sheridan *et al.*, *Science*, 277: 818-821 (1997) y en Pan *et al.*, *Science*, 277: 815-818 (1997), se describe otra molécula que se piensa que es un receptor para Apo2L/TRAIL (véase también el documento WO98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998; y el documento WO98/41629 publicado el 24 de septiembre de 1998). Esta molécula se denomina DR5 (también se denomina, de manera alternativa, Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER (Sreaton *et al.*, *Curr. Biol.*, 7: 693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.*, 16: 5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17: 141-143 (1997); documento WO98/35986 publicado el 20 de agosto de 1998; documento EP870.827 publicado el 14 de octubre de 1998; documento WO98/46643 publicado el 22 de octubre de 1998; el documento WO99/02653 publicado el 21 de enero de 1999; el documento WO99/09165 publicado el 25 de febrero de 1999; y el documento WO99/11791 publicado el 11 de marzo de 1999). Al igual que DR4, se describe que DR5 contiene un dominio citoplasmático de muerte y que es capaz de señalar la apoptosis. La estructura cristalina del complejo formado entre Apo2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz *et al.*, *Molecular Cell*, 4: 563-571 (1999).
- Recientemente se ha identificado otro receptor más, DR6, que contiene un dominio de muerte (Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 431: 351-356 (1998)). Además de contener cuatro supuestos dominios ricos en cisteína extracelulares y un dominio citoplasmático de muerte, se piensa que DR6 contiene una supuesta secuencia de cremallera de leucina que solapa con un motivo rico en prolina en la región citoplasmática. El motivo rico en prolina se asemeja a secuencias que se unen con dominios de homología src de tipo 3, que se encuentran en muchas moléculas de transducción de señales intracelulares.
- Otro grupo de receptores recientemente identificado se denomina "receptores señuelo", que se piensa que actúan como inhibidores, en lugar de como transductores de señalización. Este grupo incluye DcR1 (denominado también TRID, LIT o TRAIL-R3) (Pan *et al.*, *Science*, 276: 111-113 (1997); Sheridan *et al.*, *Science*, 277: 818-821 (1997); McFarlane *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272: 25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, *FEBS Letters*, 416: 329-334 (1997); Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186: 1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya *et al.*, *J. Immunol.*, 160: 3-6 (1998)) y DcR2 (denominado también TRUNDD o TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 7: 1003-1006 (1997); Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 424: 41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, *Immunity*, 7: 813-820 (1997)), siendo ambas moléculas de la superficie celular, así como OPG (Simonet *et al.*, citado anteriormente; Emery *et al.*, citado más adelante) y DcR3 (Pitti *et al.*, *Nature*, 396: 699-703 (1998)) siendo ambas proteínas solubles secretadas.
- Miembros adicionales recientemente identificados de la familia de TNFR incluyen CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1, y TNFL1 (Brojatsch *et al.*, *Cell*, 87: 845-855 (1996); Montgomery *et al.*, *Cell*, 87: 427-436 (1996); Marsters *et*

al., J. Biol. Chem., 272: 14029-14032 (1997); Nocentini *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6216-6221 (1997); Emery *et al.*, J. Biol. Chem., 273: 14363-14367 (1998); documento WO99/04001 publicado el 28 de enero de 1999; documento WO99/07738 publicado el 18 de febrero de 1999; documento WO99/33980 publicado el 8 de julio de 1999).

5 Como han revisado recientemente Tewari *et al.*, el TNFR1, el TNFR2 y el CD40 modulan la expresión de citocinas proinflamatorias y coestimuladoras, de receptores de citocinas y de moléculas de adhesión celular a través de la activación del factor de transcripción, NF- κ B (Tewari *et al.*, Curr. Op. Genet. Develop., 6: 39-44 (1996)). NF- κ B es el prototipo de una familia de factores de transcripción diméricos cuyas subunidades contienen regiones Rel conservadas (Verma *et al.*, Genes Develop., 9: 2723-2735 (1996); Baldwin, Ann. Rev. Immunol., 14: 649-681 (1996)). En su forma latente, el NF- κ B forma complejos con miembros de la familia de inhibidores I- κ B; después de la inactivación de I- κ B en respuesta a determinados estímulos, el NF- κ B liberado se transloca al núcleo donde se une a secuencias de ADN específicas y activa la transcripción de genes. Como se ha descrito anteriormente, los miembros de TNFR identificados hasta ahora incluyen o carecen de una región de dominio de muerte intracelular. Algunas moléculas de TNFR que carecen de un dominio de muerte, tales como TNFR2, CD40, HVEM y GITR, son capaces de modular la actividad de NF- κ B: (véase, por ejemplo Lotz *et al.*, J. Leukocyte Biol., 60: 1-7 (1996)).

Para una revisión de la familia de citocinas de TNF y sus receptores, véase Ashkenazi y Dixit, Science, 281: 1305-1308 (1998); Golstein, Curr. Biol., 7: 750-753 (1997); Gruss y Dower, citado anteriormente, y Nagata, Cell, 88: 355-365 (1997).

B Antígenos de superficie celular

25 Los linfocitos son uno de los muchos tipos de leucocitos producidos en la médula ósea durante el proceso de hematopoyesis. Hay dos poblaciones principales de linfocitos: los linfocitos B (células B) y los linfocitos T (células T). Los linfocitos de particular interés en el presente documento son las células B.

30 Las células B maduran en la médula ósea y conducen a que la médula ósea exprese un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B no expuesta se encuentra por primera vez con el antígeno para el que es específico su anticuerpo unido a la membrana, la célula comienza a dividirse rápidamente y su descendencia se diferencia en células B de memoria y en células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una esperanza de vida más larga y continúan expresando anticuerpos unido a membrana con la misma especificidad que la célula parental original. Las células plasmáticas no producen anticuerpos unidos a membrana pero en cambio producen el anticuerpo en una forma que puede secretarse. Los anticuerpos secretados son las moléculas efectoras principales de la inmunidad humoral.

40 El antígeno CD20 (denominado también antígeno de diferenciación restringida a linfocitos B humanos, Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en linfocitos pre-B y B maduros (Valentine *et al.* J. Biol. Chem. 264(19): 11282-11287 (1989); y Einfeld *et al.* EMBO J. 7(3): 711-717 (1988)). El antígeno también se expresa en linfomas no Hodgkin (NHL) de células B a un nivel mayor del 90 % (Anderson *et al.* Blood 63(6): 1424-1433 (1984)), pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder *et al.* J. Immunol. 135(2): 973-979 (1985)). CD20 regula una o más etapas tempranas en el proceso de activación del inicio y diferenciación del ciclo celular (Tedder *et al.*, citado anteriormente) y posiblemente actúa como un canal de ión calcio (Tedder *et al.* J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990)).

50 Dada la expresión de CD20 en linfomas de células B, este antígeno puede servir como un candidato para "dirigirse a" dichos linfomas. En esencia, dicho direccionamiento puede generalizarse de la siguiente manera: a un paciente se le administra anticuerpos específicos contra el antígeno de superficie CD20 de células B. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno CD20 de células B tanto (aparentemente) normales como malignas; el anticuerpo unido al antígeno de superficie CD20 puede conducir a la destrucción y empobrecimiento de células B neoplásicas. Adicionalmente, agentes químicos o marcadores radiactivos que tienen la posibilidad de destruir el tumor pueden conjugarse con el anticuerpo anti-CD20 de tal manera que el agente se "administra" específicamente a las células B neoplásicas. Independientemente de la estrategia, un objetivo principal es destruir el tumor; la estrategia específica puede determinarse mediante el anticuerpo anti-CD20 particular que se utilice y, por tanto, las estrategias disponibles para direccionar el antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

60 CD19 es otro antígeno que se expresa en la superficie de células de linaje B. Al igual que CD20, CD19 se encuentra en las células a lo largo de la diferenciación del linaje desde la fase de células madre hasta un punto justo antes de la diferenciación terminal en células plasmáticas (Nadler, L. Lymphocyte Typing II 2: 3-37 y Appendix, Renling *et al.* eds. (1986) de Springer Verlag). Sin embargo, a diferencia de CD20, el anticuerpo de unión a CD19 causa la internalización del antígeno CD19. El antígeno CD19 se identifica por el anticuerpo HD237-CD19 (denominado también anticuerpo "B4") (Kiesel *et al.* Leukemia Research II, 12: 1119 (1987)), entre otros. El antígeno CD19 está presente en el 4-8 % de las células mononucleares de sangre periférica y a un nivel mayor del 90 % de células B aisladas de sangre periférica, bazo, ganglios linfáticos o amígdalas. El CD19 no se detecta en células T de sangre periférica, monocitos o granulocitos. Prácticamente todas las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) de células no T,

leucemias linfocíticas crónicas (LLC) de células B y linfomas de células B expresan CD19 detectable por el anticuerpo B4 (Nadler *et al.* J. Immunol. 131: 244 (1983); y Nadler *et al.* en Progress in Hematology Vol. XII páginas 187-206. Brown, E. ed. (1981) by Grune & Stratton, Inc).

5 Se han identificado otros anticuerpos que reconocen antígenos específicos en fase de diferenciación expresados por células del linaje de células B. Entre estos se encuentran el anticuerpo B2 dirigido contra el antígeno CD21; el anticuerpo B3 dirigido contra el antígeno CD22; y el anticuerpo J5 dirigido contra el antígeno CD10 (denominado también CALLA). Véase la Patente de Estados Unidos Nº 5.595.721 expedida el 21 de enero de 1997 (Kaminski *et al.*).

10 El anticuerpo rituximab (RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado por ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la Patente de Estados Unidos Nº 5.736.137 presentada el 7 de abril de 1998 (Anderson *et al.*). RITUXAN® se indica para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de células B reincidente o refractario de grado bajo o folicular, positivo a CD20. Mecanismos de estudios de acción *in vitro* han demostrado que RITUXAN® se une al complemento humano y produce la lisis de líneas de células B linfoides a través de la CDC (Reff *et al.* Blood 83(2): 435-445 (1994)). Adicionalmente, tiene actividad significativa en ensayos para CCDA. Más recientemente, se ha demostrado que RITUXAN® tiene efectos antiproliferativos en ensayos de incorporación de timidina marcada con tritio e inducen la apoptosis directamente, mientras que otros anticuerpos anti-CD19 y CD20 no tienen esos efectos (Maloney *et al.* Blood 88(10): 637a (1996)). La sinergia entre RITUXAN® y quimioterapias y toxinas también se ha observado experimentalmente. En particular, RITUXAN® sensibiliza líneas celulares de linfoma de células B humanas resistente a fármacos contra los efectos citotóxicos de la doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina diftérica y ricina (Demidem *et al.* Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186 (1997)). Estudios preclínicos *in vivo* han demostrado que RITUXAN® causa el empobrecimiento de células B de la sangre periférica, ganglios linfáticos y médula ósea de monos cinomolgos, presumiblemente a través de procesos mediados por células y por el complemento (Reff *et al.* Blood 83(2): 435-445 (1994)).

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona anticuerpos multivalentes (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes) con cuatro o más sitios de unión a antígeno, como se expone en la reivindicación 1. En una realización el anticuerpo multivalente comprende cinco o más (por ejemplo hasta aproximadamente ocho) sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente del presente documento no es preferentemente una IgA o IgM de secuencia nativa, y puede tener solo una región Fc.

35 Los anticuerpos multivalentes del presente documento tienen propiedades que son deseables, entre otras cosas, desde un punto de vista terapéutico. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente puede (1) internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al cual se unen los anticuerpos; (2) ser un anticuerpo agonista; y/o (3) inducir la muerte celular y/o apoptosis de una célula que exprese un antígeno al cual puede unirse el anticuerpo multivalente. El "anticuerpo parental" que proporciona al menos una especificidad de unión a antígeno del anticuerpo multivalente, puede ser uno que esté internalizado (y/o catabolizado) por una célula que exprese un antígeno al cual se une el anticuerpo; y/o puede ser un anticuerpo agonista, inductor de muerte celular y/o inductor de apoptosis, y la forma multivalente del anticuerpo como se describe en el presente documento puede presentar una o más mejoras en una o más de estas propiedades.

45 Además, el anticuerpo parental puede carecer de cualquiera de una o más de estas propiedades, pero puede dotarse de ellas cuando se construye como un anticuerpo multivalente como se describe en el presente documento.

50 Los cuatro o más sitios de unión a antígeno de los anticuerpos multivalentes del presente documento pueden unirse al mismo antígeno o pueden unirse a dos o más (por ejemplo, de dos a aproximadamente tres) antígenos diferentes.

El anticuerpo multivalente puede unirse (1) a una proteína de superficie celular expresada (o sobreexpresada) por células tumorales, por ejemplo, al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), al receptor de HER2, al receptor de HER3, al receptor de HER4 o a DcR3; (2) a un receptor en la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (por ejemplo, un receptor de Apo2L, tal como DR4, DR5, DcR1 o DcR2); y/o (3) a un antígeno de superficie de células B (tal como CD19, CD20, CD22 o CD40). En la realización preferida de la invención, todos los sitios de unión a antígeno funcionales del anticuerpo multivalente se unen a los mismos antígenos que los indicados anteriormente (por ejemplo, los cuatro sitios de unión a antígeno de un anticuerpo tetravalente se unen con cualquiera de (1), (2) o (3)).

60 La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo multivalente conjugado con un agente citotóxico. El agente citotóxico del presente documento puede ser uno que sea activo en la destrucción de células una vez internalizado.

65 En el presente documento se desvela una cadena polipeptídica que comprende VD1-(X1)_n-VD2 (X2)_n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena polipeptídica puede

comprender una cadena VH-CH1-engarce flexible-VH-CH1-región Fc; una cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc; una cadena VL-CL-engarce flexible-VL-CL-región Fc o una cadena VL-CL-VL-CL-región Fc. La cadena polipeptídica puede comprender un dominio de dimerización VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1; un dominio de dimerización VH-CH1-VH-CH1; un dominio de dimerización VL-CL-enlazador flexible-VL-CL o un dominio de dimerización VL-CL-VL-CL. Por ejemplo, la cadena polipeptídica puede comprender una región bisagra VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1; una región bisagra VH-CH1-VH-CH1. El presente documento se desvela un anticuerpo que comprende una o más (preferentemente dos) de dichas cadenas polipeptídicas. Preferentemente el anticuerpo comprende adicionalmente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena pesada o cadena ligera, por ejemplo, en el que los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera comprenden VL-CL y los polipéptidos de dominio variable de cadena pesada comprenden VH-CH1.

En el presente documento se desvela una cadena polipeptídica que comprende tres o más dominios variables de cadena pesada o cadena ligera, en el que cada uno de los dominios variables puede combinarse con tres o más polipéptidos de dominio variable de cadena pesada o cadena ligera para formar tres o más sitios de unión a antígeno, cada uno de ellos dirigido contra el mismo antígeno. En el presente documento se desvela un anticuerpo aislado que comprende la cadena polipeptídica. Cuando la cadena polipeptídica comprende tres o más dominios variables de cadena pesada, el anticuerpo puede comprender adicionalmente tres o más polipéptidos de dominio variable de cadena ligera que pueden combinarse con los dominios variables de cadena pesada para formar los tres o más sitios de unión a antígeno. En la Figura 23D se muestran ejemplos de dichos antígenos (con tres sitios de unión a antígeno) y en la Figura 23E (con cuatro sitios de unión a antígeno). En el presente documento se desvela una cadena polipeptídica que comprende la fórmula: (a) VL-CL-enlazador flexible-VL-CL-enlazador flexible-VL-CL; (b) VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1; (c) (VL-CL)_n, en la que n es tres o más; o (d) (VH-CH1)_n, en la que n es tres o más.

La invención también proporciona: ácidos nucleicos aislados que codifican el anticuerpo multivalente; un vector que comprende ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multimérico, opcionalmente, unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transformada con el vector; comprendiendo una célula hospedadora (por ejemplo transformada con) ácido nucleico que codifica el anticuerpo multimérico o cadena polipeptídica; un método para producir el anticuerpo multivalente comprende cultivar la célula hospedadora de tal manera que el ácido nucleico se exprese y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo multivalente o cadena polipeptídica del cultivo de la célula hospedadora (por ejemplo, del medio de cultivo de la célula hospedadora). Los ácidos nucleicos que codifican (1) los dominios variables de cadena pesada y (2) los dominios variables de cadena ligera del anticuerpo multivalente se coexpresan preferentemente por una célula hospedadora transformada tanto con (1) como con (2). Los ácidos nucleicos (1) y (2) pueden estar presentes en los mismos vectores, o en vectores diferentes.

En presente documento se contemplan usos de diagnóstico y terapéuticos para los anticuerpos multivalentes descritos. En el presente documento se desvela un método para determinar la presencia de un antígeno de interés que comprende exponer una muestra que se sospecha que contiene el antígeno al anticuerpo multivalente determinar la unión del anticuerpo multivalente con la muestra. En el presente documento se desvelan métodos de diagnóstico tanto *in vitro* como *in vivo*.

En el presente documento se desvela un método de tratamiento de un mamífero que padece, o está predispuesto a, una enfermedad o un trastorno, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multivalente como se desvela en el presente documento, o de una composición que comprende el anticuerpo multivalente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El trastorno a tratar en el presente documento puede ser cáncer, en cuyo caso el método puede comprender adicionalmente administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente citotóxico. En el presente documento se desvela un método para inducir la apoptosis de una célula cancerosa que comprende exponer la célula a un anticuerpo multivalente como se describe en el presente documento, en el que el anticuerpo multivalente se une a un receptor en la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). El método puede implicar destruir una célula B exponiendo la célula B a un anticuerpo multivalente que se une a un antígeno de superficie de célula B. Además, el método puede relacionarse con la destrucción de una célula que exprese (o sobreexpres) un receptor de ErbB que comprende exponer la célula a un anticuerpo que se une al receptor de ErbB.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de una IgG nativa y de su digestión con (1) papaína para generar dos fragmentos Fab y una región Fc o (2) pepsina para generar un fragmento F(ab')₂ y fragmentos pequeños múltiples. Los enlaces disulfuro se representan por líneas entre los dominios CH1 y CL y los dos dominios CH2. V es dominio variable; C es dominio constante; L representa la cadena ligera y H representa la cadena pesada.

Las Figuras 2A-E representan las estructuras de los cinco isotipos de inmunoglobulina principales de origen natural; IgG (Fig. 2A), IgD (Fig. 2B), IgE (Fig. 2C), dímero de IgA (Fig. 2D) y el pentámero de IgM (Fig. 2E).

La Figura 3 representa alineamientos de secuencias nativas de regiones Fc de IgG. Se muestran las secuencias de la región Fc de la IgG humana de secuencia nativa, IgG1hum (alotipos no-A y A) (SEC ID Nos: 1 y 2,

respectivamente), IgG2hum (SEQ ID NO: 3), IgG3hum (SEQ ID NO: 4) e IgG4hum (SEQ ID NO: 5). La secuencia IgG1 humana es el alotipo no A, y las diferencias entre esta secuencia y las del alotipo A (en las posiciones 356 y 358; sistema de numeración EU) se muestran debajo de la secuencia IgG1 humana. También se muestran las secuencias de la región Fc de la IgG murina de secuencia nativa, IgG1mur (SEQ ID NO: 6), IgG2Amur (SEQ ID NO: 7), IgG2Bmur (SEQ ID NO: 8) e IgG3mur (SEQ ID NO: 9).

Las Figuras 4A-B representan esquemáticamente anticuerpos tetravalentes de acuerdo con la presente invención. En la Figura 4A, se enumeran los cuatro Fab de unión a antígeno (1 y 2 para cada brazo del anticuerpo tetravalente) y X representa un dominio de dimerización. En la Figura 4B, el dominio de dimerización del anticuerpo tetravalente es una región Fc.

La Figura 5 muestra la construcción usada para la expresión de un anticuerpo anti-HER2 tetravalente (OctHER2) en el Ejemplo 1.

Las Figuras 6A-C ilustran la unión de OctHER2 (Fig. 6A); de rhuMAB de IgG1 bivalente 4D5-8 expresado por células 293 (Fig. 6B); y de HERCEPTIN® en viales (expresado por células de ovario de hámster Chino (CHO)) (Fig. 6C) con el dominio extracelular (DEC) de HER2 tal y como se determina usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La Figura 7 representa un análisis de ultracentrifugación de la unión de OctHER2 al DEC de HER2. Se muestran los pesos moleculares promedio (teóricos o determinados experimentalmente) frente a la proporción molar de OctHER2 contra el DEC de HER2. Los pesos moleculares promedio teóricos calculados suponiendo que el anticuerpo tetravalente tiene cuatro sitios de unión completamente funcionales se muestra con círculos; los pesos moleculares promedio calculados teóricos suponiendo que el anticuerpo tetravalente tiene tres sitios de unión completamente funcionales se muestran con cuadrados; y los triángulos representan pesos moleculares determinados experimentalmente.

Las Figuras 8A-D representan la actividad inhibidora del crecimiento de HERCEPTIN® en comparación con OctHER2 usando las líneas celulares SKBR3 (que sobreexpresa HER2 3+) (Fig. 8A), MDA 361 (que sobreexpresa HER2 2+) (Fig. 8B), BT474 (que sobreexpresa HER2 3+) (Fig. 8C) y MCF7 (que expresa HER2 0+) (Fig. 8D).

La Figura 9 representa el efecto de enlazadores flexibles sobre la actividad inhibidora del crecimiento de los anticuerpos anti-HER2 tetravalentes con respecto a células MDA 231 (que sobreexpresan HER2 1+) o células SKBR3 (que sobreexpresan HER2 3+).

Las Figuras 10A-B comparan la tasa de internalización/catabolismo de OctHER2 (Fig. 10A) con la de la HERCEPTIN® (Fig. 10B) en relación con las líneas celulares tanto de MDA 453 (que sobreexpresan HER2 2+) como de SKBR3 (que sobreexpresan HER2 3+).

Las Figuras 11A-I son fotografías de microscopía electrónica que muestran la internalización de OctHER2. Las Figuras 11A-F muestran la localización subcelular de ¹²⁵I-OctHER2 en células SKBR3. Se observaron en granos de plata autorradiográficos asociados con las vellosidades de la membrana celular apical (Fig. 11A), en estrecha proximidad con una formación de fosa recubierta (Fig. 11B, flecha), con vesículas citosólicas moderadas (Figs. 11C y D) y endosomas (Figs. 11 E y F). Barras = 0,25 μM. Las Figs. 11G-I muestran la internalización a las 0 horas (Fig. 11 G) y 5 horas (Figs. 11H y 11I).

Las Figuras 12A-E representan la apoptosis inducida por un anticuerpo tetravalente anti-DR5 (16E2 Octopus), un anticuerpo IgG bivalente anti-DR5 (16E2 IgG) y Apo2L/TRAIL (Apo2L) en líneas de células de cáncer: COLO 205 (Fig. 12A), SK-MES-1 (Fig. 12B), HCT116 (Fig. 12C) y HOP 92 (Fig. 12D), en comparación con una línea celular de control no cancerosa, HUMEC (Fig. 12E).

Las Figuras 13A-D son portaobjetos histológicos teñidos para detectar células apoptóticas. Los tejidos tumorales de ratones tratados con 16E2 Octopus o Apo2L/TRAIL se fijaron en formalina al 10 % y después se embebieron en parafilm y se seccionaron en los portaobjetos que después se tiñeron con hematoxilina y eosina y se visualizaron con un aumento de 400X. El efecto de 16E2 Octopus a las 6 y 24 horas se muestra en las Figs. 13A y B, respectivamente; en la Figura 13C se muestran las células tratadas con control; y en la Figura 13D se muestran las células tratadas con Apo2L/TRAIL.

La Figura 14 representa la actividad *in vivo* de Apo2L/TRAIL (60 mg/kg, 5 x/semana), IgG 3H3 bivalente (5 mg/kg administrada los días 0, 3, 5 y 9), IgG bivalente 16E2 (16E2) (5 mg/kg administrada los días 0, 3, 5 y 9) y 16E2 Octopus (5 mg/kg administrado los días 0, 3, 5 y 9) con respecto a tumores COLO 205 en ratones desnudos atímicos.

La Figura 15 representa un ensayo *in vitro* con alamar Azul confirmando la actividad apoptótica del material usado en los estudios con ratones (Apo2L/TRAIL y 16E2 Octopus) en comparación con un control positivo convencional con Apo2L. Se confirmó que el anticuerpo anti-IgE (E25) usado como un control negativo en los estudios con ratones tenía actividad no apoptótica.

La Figura 16 representa los resultados de un ensayo de apoptosis con cristal violeta comparando el anti-DR5 3H3 Octopus con diversos lotes de anti-DR5 16E2 Octopus.

Las Figuras 17A-B revelan los resultados del ensayo de apoptosis con alamar Azul con respecto a Apo2L/TRAIL (documento WO97/25428), anticuerpo anti-DR5 3H3 Octopus, anticuerpo anti-DR5 16E2 Octopus y Apo2L/TRAIL con una etiqueta epitópica FLAG entrecruzada mediante un anticuerpo anti-FLAG (documento WO97/25428) con respecto a células SK-MES-1 (Fig. 17A) y Jurkat (Fig. 17B) en presencia de suero bovino fetal (FBS) al 5 %.

Las Figuras 18A-C representan curvas de respuesta a la dosis que muestran el efecto del anti-DR5 16E2 Octopus (gráficos superiores) en comparación con Apo2L/TRAIL (gráficos inferiores) sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas de leucemia, de cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de colon, cáncer del

sistema nervioso central (SNC), melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de mama al cabo de 2 días. Los resultados proceden del National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program. Todas las muestras se ensayaron a 5 concentraciones, comenzando al 1 % de la solución madre (solución madre de 16E2 Octopus 0,2 mg/ml) y 4 x 0,5 diluciones log.

Las Figuras 19A-C representan curvas de respuesta a la dosis que muestran el efecto del anti-DR5 16E2 (gráficos superiores) en comparación con Apo2L/TRAIL (gráficos inferiores) sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas de leucemia, de cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central (SNC), melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de mama al cabo de 6 días. Los resultados proceden del National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program. Todas las muestras se ensayaron a 5 concentraciones, comenzando al 1 % de la solución madre (solución madre de 16E2 Octopus 0,2 mg/ml) y 4 x 0,5 diluciones log.

Las Figuras 20A-B presentan un resumen cuantitativo de los resultados *in vitro* de 2 días del National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program que compara el anti-DR516E2 Octopus (Fig. 20A) con Apo2L/TRAIL (Fig. 20B) analizando la inhibición del crecimiento (GI50), la estasia (TGI) y la toxicidad (LC50).

Las Figuras 21A-B presentan un resumen cuantitativo de los resultados *in vitro* a los 6 días del National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program que compara el anti-DR516E2 Octopus (Fig. 21A) con Apo2L/TRAIL (Fig. 21B) analizando la inhibición del crecimiento (GI50), la estasia (TGI) y la toxicidad (LC50).

La Figura 22 representa la apoptosis de células Wil-2 por el anticuerpo anti-CD20 RITUXAN®, RITUXAN® entrecruzado con el anti-IgG humano (RITUXAN®-IgG) y un anticuerpo tetravalente anti-CD20 (OctCD20).

Las Figuras 23A-E son dibujos que representan el anticuerpo Octopus/tetravalente de longitud completa (Fig. 23B), el F(ab')₂ de Octopus (Fig. 23C), POPoct-3 Fab (Fig. 23D) y POPoct-4 Fab (Fig. 23E) en comparación con la IgG nativa (Fig. 23A). Un gel de Tris-Glicina teñido con coomassie de proteínas Octopus anti-CD20 (C2B8) compara los tamaños de los anticuerpos intactos en condiciones no reductoras (Fig. 23F), y de las cadenas pesadas en condiciones reductoras, bajo las cuales los enlaces disulfuro se alteran dando como resultado la separación de las cadenas pesada y ligera (Fig. 23G).

La Figura 24 representa la construcción de la estructura F(ab')₂ de Octopus. Cualquier región VH/CH1 puede sustituirse en la estructura F(ab')₂ con los sitios de restricción enzimática BamHI, NheI y BspEI.

La Figura 25 representa la construcción de la cadena pesada de POPoct-3.

La Figura 26 representa la construcción de la cadena pesada de POPoct-4.

La Figura 27 representa la actividad de los anticuerpos anti-HER2 multivalentes en ensayos de citóstasis usando células BT474.

Las Figuras 28A-B representan la actividad de anticuerpos anti-HER2 multivalentes en ensayos de citóstasis usando células SKBR3. Las figuras son gráficas representativas de n=4 ensayos de citóstasis.

Las Figuras 29A-B representan la capacidad de internalización de los anticuerpos anti-HER2 multivalentes en células SKBR3 (Fig. 29A) y células BT474 (Fig. 29B).

Las Figuras 30A-B revelan la apoptosis de células COLO205 por los anticuerpos anti-DR5 multivalentes.

Las Figuras 31A-B demuestran la señalización de anticuerpos anti-DR5 multivalentes a través de la ruta caspasa.

La Figura 32 compara la apoptosis inducida por RITUXAN® entrecruzado con IgG (RITUXAN-IgG) y OctCD20 entrecruzado con IgG (OctCD20-IgG).

La Figura 33 muestra la apoptosis de células WIL2 por anticuerpos anti-CD20 multivalentes, el anticuerpo anti-CD20 IF5 (Clark *et al.* PNAS (USA) 82: 1766-1770 (1985)) y el anticuerpo IF5 entrecruzado con IgG (IF5 + IgG-X).

La Figura 34 representa la adhesión celular homotípica en células WIL2S inducida por el anticuerpo anti-CD20 IF5, anticuerpo IF5 entrecruzado con IgG y POPoct-3 CD20.

La Figura 35 refleja la internalización/catabolismo de RITUXAN® u OctCD20 en líneas de linfoma de células B Ramos, WIL2 y DB.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU, como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo humano de IgG1 EU.

Un "receptor de ErbB" es un receptor de la proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores de ErbB e incluye los receptores EGFR, HER2, ErbB3 y ErbB4 así como TEGFR (Patente de Estados Unidos N° 5.708.156) y otros miembros de esta familia a identificar en el futuro. El receptor de ErbB generalmente comprenderá un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando de ErbB; un dominio lipófilo transmembrana; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo terminal que lleva algunos restos de tirosina que pueden estar fosforilados. El receptor de ErbB puede ser un receptor de ErbB de secuencia nativa o una variante de la secuencia de aminoácidos del mismo. Preferentemente el receptor de ErbB es un receptor de ErbB humano de secuencia nativa.

Por "ligando de ErbB" se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor de ErbB. El ligando de ErbB de particular interés del presente documento es un ligando de ErbB humano se secuencia nativa tal como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) (Savage *et al.*, J. Biol. Chem. 247: 7612-7621 (1972)); Factor alfa de Crecimiento Transformante (TGF-alfa) (Marquardt *et al.*, Science 223: 1079-1082 (1984)); anfíregulina también conocida como schwanoma o factor de crecimiento autocrino de queratinocitos (Shoyab *et al.* Science 243: 1074-1076 (1989); Kimura *et al.* Nature 348: 257-260 (1990); y Cook *et al.* Mol. Cell. Biol. 11: 2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing *et al.*, Science 259: 1604-1607 (1993); y Sasada *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 190: 1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, Science 251: 936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 7495-7500 (1995); y Komurasaki *et al.* Oncogene 15: 2841-2848 (1997)); una herregulina (ver a continuación); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, Nature 387: 512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 9562-9567 (1997)); o cripto (CR-1) (Kannan *et al.* J. Biol. Chem. 272 (6): 3330-3335 (1997)). Los ligandos de ErbB que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfíregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos de ErbB que se unen a ErbB3 incluyen heregulinas. Los ligandos de ErbB capaces de unirse a ErbB4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y heregulinas.

La "heregulina" (HRG), cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el producto génico de heregulina tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5,641,869 o en Marchionni *et al.*, Nature, 362:312-318 (1993) y variantes biológicamente activas de dichos polipéptidos. Ejemplos de heregulinas incluyen heregulin-alfa, heregulin-beta1, heregulin-beta2 y heregulin-beta3 (Holmes *et al.*, Science, 256:1205-1210 (1992); y la Patente de Estados Unidos N.º 5.641.869); factor de diferenciación neu (NDF) (Peles *et al.* Cell 69: 205-216 (1992)); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls *et al.* Cell 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento glial (GGF) Marchionni *et al.*, Nature, 362:312-318 (1993); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho *et al.* J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); gamma-herregulina (Schaefer *et al.* Oncogene 15:1385-1394 (1997)). Un ejemplo de fragmentos biológicamente activos/variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido HRG de secuencia nativa, es un fragmento del dominio de tipo EGF (por ejemplo, HRGbeta₁₁₇₇₋₂₄₄).

Un "hetero-oligómero de ErbB" de la presente invención es un oligómero asociado no covalentemente que comprende al menos dos receptores de ErbB diferentes. Dichos complejos se pueden formar cuando una célula que expresa dos o más receptores de ErbB se expone a un ligando de ErbB y se puede aislar mediante inmunoprecipitación y se puede analizar mediante SDS-PAGE tal como se describe en Sliwkowski *et al.*, J. Biol. Chem. 269(20): 14661-14665 (1994), por ejemplo. Ejemplos de dichos hetero-oligómeros de ErbB incluyen los complejos EGFR-ErbB2, ErbB2-ErbB3 y ErbB3-ErbB4. Además, el hetero-oligómero de ErbB puede comprender dos o más receptores de ErbB combinados con un receptor de ErbB diferente, tal como ErbB3, ErbB4 o EGFR. Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citocina (por ejemplo, gp130) se pueden incluir en el hetero-oligómero.

Los términos y expresiones "ErbB1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a secuencias nativas de EGFR tal como se divulga, por ejemplo, en Carpenter *et al.* Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914 (1987), incluyendo sus variantes (por ejemplo una mutante de delección de EGFR tal como en Humphrey *et al.* PNAS (EE.UU.) 87: 4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto proteico de EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tal como 225 (C225) quimerizado y 225 reconfigurado humano (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.).

Los términos "ErbB2" y "HER2" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a proteínas HER2 humanas de secuencia nativa descritas, por ejemplo, en Semba *et al.*, PNAS (EE.UU.) 82: 6497-6501 (1985) y en Yamamoto *et al.* Nature 319: 230-234 (1986) (número de referencia Genebank X03363), y sus variantes. El término *erbB2* se refiere al gen que codifica el HER2 humano y *neu* se refiere al gen que codifica al p185^{neu} de rata. La secuencia de HER2 preferida es la secuencia humana de HER2 nativa. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a HER2 incluyen los MAb 4D5 (ATCC CRL 10463), 2C4 (ATCC HB-12697), 7F3 (ATCC HB-12216) y 7C2 (ATCC HB 12215) (véase, la Patente de Estados Unidos N° 5.772.997; documento WO98/77797; y Patente de Estados Unidos N° 5.840.525). Los anticuerpos anti-HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como se describe en la Tabla 3 de la Patente de Estados Unidos 5.821.337; 520C9 humanizado (documento WO93/21319). Los anticuerpos anti-HER2 humanos se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.772.997 expedida el 30 de junio de 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero de 1997.

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor tal como se divulga, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.183.884 y 5.480.968 así como en Kraus *et al.* PNAS (EE.UU.) 86: 9193-9197 (1989), incluyendo sus variantes. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a HER3 se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.968.511 (Akita y Sliwkowski), por ejemplo, el anticuerpo 8B8 (ATCC HB 12070) o una variante humanizada del mismo.

Los términos “ErbB4” y “HER4” en el presente documento se refieren al polipéptido receptor tal como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Europea N° 599.274; Plowman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, Nature, 366: 473-475 (1993), incluyendo variantes de los mismos tal como las isoformas de HER4 divulgadas en el documento WO 99/19488.

5 Un “marcador de superficie de célula B” en el presente documento es un antígeno que se expresa en la superficie de una célula B que puede dirigirse con un anticuerpo que se une al mismo. Los marcadores de superficie de célula B a modo de ejemplo incluyen los marcadores de superficie leucocitarios CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, 10 CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86. El marcador de superficie de célula B de particular interés se expresa preferentemente en células B en comparación con otros tejidos que no tienen células B de un mamífero y pueden expresarse tanto en células B precursoras como en células B maduras. En una realización, el marcador es uno, como CD20 o CD19, que se encuentra en las células B a lo largo de la diferenciación del linaje desde la etapa de célula madre hasta un punto inmediatamente anterior a la diferenciación terminal en células plasmáticas. Los 15 marcadores de superficie de células B preferidos en el presente documento son CD19, CD20, CD22 y CD40.

El antígeno “CD20” es una fosfoproteína no glucosilada, de aproximadamente 35 kDa, que se encuentra en la superficie de más del 90 % de las células B de la sangre periférica o de los órganos linfoides. CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de la célula pre-B y permanece en el plasma hasta la diferenciación en célula plasmática. CD20 está presente tanto en células B normales como en células B malignas. Otros nombres para CD20 en la bibliografía incluyen “antígeno restringido a linfocitos B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se describe en Clark *et al.* PNAS (EE.UU.) 82: 1766 (1985), por ejemplo. Los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD20 incluyen: “C2B8” que actualmente se denomina “rituximab” (“RITUXAN®”) (Patente de Estados Unidos N° 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con iridio-[90] denominado “Y2B8” (Patente de Estados Unidos N° 5.736.137); el 20 IgG2a “B1” murino opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo “¹³¹I-B1” (BEXXAR™) (Patente de Estados Unidos N° 5.595.721); el anticuerpo monoclonal murino “1F5” (Press *et al.* Blood 69(2): 584-591 (1987)); el anticuerpo “quimérico 2H7” (Patente de Estados Unidos N° 5.677.180); y los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles en el Congreso Internacional de Tipificación de Anticuerpos (Valentine *et al.*, En: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., página 440, Oxford University Press (1987)).

El antígeno “CD19” se refiere al antígeno de aproximadamente 90 kDa identificado, por ejemplo, por el anticuerpo HD237-CD19 o B4 (Kiesel *et al.* Leukemia Research II, 12: 1119 (1987)). Al igual que CD20, CD19 se encuentra en las células a lo largo de la diferenciación del linaje desde la etapa de célula madre hasta un punto inmediatamente anterior a la diferenciación terminal en células plasmáticas. La unión de un anticuerpo a CD19 puede causar la 30 internalización del antígeno CD19. Los ejemplos de anticuerpos que se unen en el antígeno CD19 incluyen los anticuerpos anti-CD19 en Hekman *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 32: 364-372 (1991) y Vlasveld *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 40: 37-47 (1995); y el anticuerpo B4 en Kiesel *et al.* Leukemia Research II, 12: 1119 (1987).

El antígeno “CD22” tiene un peso molecular de aproximadamente 140.000 kDa. El CD22 se expresa en el citoplasma de células pre-B tempranas y progenitoras, aparece solo en la superficie de células B maduras y en la mayoría de las células de linfoma no Hoggkin (LNH), y después se pierde durante la diferenciación terminal anterior a la etapa de célula plasmática tanto en la superficie como en el citoplasma. Un ejemplo de un anticuerpo anti-CD22 es el anticuerpo LL2 descrito en Juweid *et al.* Cancer Research 55: 5899-5907 (1995), incluyendo variantes químicas humanizadas del mismo.

El antígeno “CD40” es una glucoproteína fosforilada de la superficie celular que se expresa en varios tipos celulares, incluyendo las células B, las malignidades de células B, las células dendríticas foliculares, las células del epitelio basal y en carcinomas. CD40 se une al ligando de CD40 (CD40L). Aparte de ser un antígeno de superficie célula B, CD40 también es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a CD40 incluyen aquellos que (1) bloquean la interacción entre CD40/CD40L y tienen propiedades antineoplásicas (Armitage *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.674.492); (2) antagoniza la señalización a través de CD40 (deBoer *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.677.165); (3) liberan una señal estimuladora a través de CD40 pero no aumenta la interacción entre CD40 y CD40L, por ejemplo, G28-5 (Ledbetter *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.182.368); (4) aumenta la interacción entre CD40 y CD40L, por ejemplo, CD40.4 (5C3) (PharMingen, San Diego, California) y S2C6 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassass, Virginia el 25 de mayo de 1999 con el número de referencia PTA-110).

La “superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral” o “superfamilia de receptores de TNF” en el presente documento se refiere a polipéptidos receptores unidos por citocinas en la familia del TNF. Generalmente, estos receptores son receptores transmembrana de Tipo I con una o más secuencias de repetición ricas en cisteína en su dominio extracelular. La superfamilia de receptores de TNF puede subdividirse además en (1) receptores de muerte; (2) receptores señuelo; y (3) receptores de señalización que carecen de dominios de muerte. Los “receptores de muerte” contienen en su región citoplasmática o intracelular un “dominio de muerte”, es decir, una región o secuencia que actúa para transducir señales en la célula que pueden dar como resultado la apoptosis o inducción de 60 determinados genes. Los “receptores señuelo” carecen de un dominio de muerte funcional y son incapaces de transducir señales que dan como resultado la apoptosis. Los ejemplos de citocinas de la familia génica del TNF 65

incluyen el Factor alfa de Necrosis Tumoral (TNF-alfa), Factor beta de Necrosis Tumoral (TNF-beta o linfo toxina), el ligando de CD30, ligando de CD27, ligando de CD40, ligando de OX-40, ligando de 4-1BB, ligando de Apo-1 (denominado también ligando de Fas o ligando de CD95), ligando de Apo-2 (denominado también TRAIL), ligando de Apo-3 (denominado también TWEAK), osteoprotegerina (OPG), APRIL, ligando de RANK (denominado también TRANCE), y TALL-1 (denominado también BlyS, BAFF o THANK). Los ejemplos de receptores de la superfamilia de receptores de TNF incluyen: el Receptor de Factor de Necrosis Tumoral de tipo 1 (TNFR1), el Receptor de Factor de Necrosis Tumoral de Tipo 2 (TNFR2), el receptor del Factor de Crecimiento Nervioso p75 (NGFR), el antígeno de superficie de células B CD40, el antígeno de células T OX-40, el receptor de Apo-1 (también denominado Fas o CD95), el receptor de Apo-3 (también denominado DR3, swl-1, TRAMP y LARD), el receptor denominado "Activador Transmembrana e Interactor de CAML" o "TACI", proteína BCMA, DR4, DR5 (alternativamente citada como Apo-2; TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER), DR6, DcR1 (también citado como TRID, LIT o TRAIL-R3), DcR2 (también citado como TRAIL-R4 o TRUNDD), OPG, DcR3 (también citado como TR6 o M68), CAR1, HVEM (también citado como ATAR o TR2), GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, CD30, receptor de Linfo toxina beta (LTBr), receptor 4-1BB y TR9 (documento EP988.371A1).

Las expresiones "ligando de Apo-2" o "Apo2L" se refieren a los polipéptidos de Apo2L que se divulgan en el documento WO97/25428, publicado el 17 de julio de 1997. Para los fines de la presente solicitud, estas expresiones se refieren a los polipéptidos denominados TRAIL que se divulgan en el documento WO97/01633, publicado el 16 de enero de 1997 y en la Patente de Estados Unidos N° 5.763.223, expedida el 9 de junio de 1998.

Un "receptor de Apo2L" es un polipéptido al cual puede unirse específicamente Apo2L. La expresión "receptor de Apo2L", cuando se usa en el presente documento, incluye a receptores de Apo2L de secuencia nativa y variantes de los mismos. Este término incluye el receptor de Apo2L de varios mamíferos, incluyendo seres humanos. El receptor de Apo2L puede aislarse de varias fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse por métodos recombinantes o sintéticos. Los ejemplos de receptores de Apo2L de "secuencia nativa" incluyen el polipéptido Apo-2 o DR5 (documento WO98/51793), DR4 de secuencia nativa tal como se describe en Pan *et al.* Science 276: 111-113 (1997); el receptor señuelo 1 de secuencia nativa o DcR1 tal como en Sheridan *et al.*, Science 277: 818-821 (1997); y el receptor señuelo 2 de secuencia nativa o DcR2 tal como en Marsters *et al.* Curr. Biol. 7: 1003-1006 (1997); la osteoprotegerina de secuencia nativa (véase Simonet *et al.* Cell 89: 309-319 (1997); y Emery *et al.* J. Interferon and Cytokine Research 18(5): A47 Resumen 2.17 (1998)). Los ejemplos de anticuerpos anti-DR5 incluyen 3F11.39.7 (ATCC HB-12456), 3H3.14.5 (ATCC HB-12534), 3D5.1.10 (HB-12536) y 3H1.18.10 (HB-12535), 16E2 y 20E6 (véase el documento WO 98/51793). Los ejemplos de los anticuerpos anti-DR4 incluyen 4E7.24.3 (ATCC HB-12454) y 4H6.17.8 (ATCC HB-12455) (véase el documento WO 99/37684).

El "DcR3" de secuencia nativa se describe en el documento WO99/14330. Esta publicación de patente describe los siguientes mA b dirigidos contra DcR3: 4C4.1.4 (ATCC HB-12573); 5C4.14.7 (ATCC HB-12574); 11C5.2.8 (ATCC HB-12572); 8D3.1.5 (ATCC HB-12571); y 4B7.1.1 (ATCC HB-12575).

Un polipéptido "de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido de origen natural. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido de origen natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o puede producirse por medios sintéticos o recombinantes. La expresión polipéptido de "secuencia nativa" incluye específicamente las formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas de variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

Una "variante" polipeptídica significa un polipéptido biológicamente activo que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 % con el polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden, o se delecionan, uno o más restos de aminoácidos en el extremo N o C del polipéptido. De manera habitual, una variante tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 %, más preferente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90 % e incluso más preferente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 % con el polipéptido de secuencia nativa.

"Apoptosis" se refiere a muerte celular programada. Los sucesos fisiológicos que normalmente son indicativos de la aparición de apoptosis incluyen: fragmentación del ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Diversos métodos están disponibles para evaluar los sucesos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (FS) puede medirse por la unión de la anexina V; la fragmentación del ADN puede evaluarse a través del escalonamiento del ADN o tinción con yoduro de propidio; y la condensación nuclear/de la cromatina así como la fragmentación del ADN puede evaluarse por cualquier aumento en las células hipodiploides.

El término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa o anticuerpos monoclonales intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos, (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos

(véase a continuación) siempre que estos exhiban la actividad biológica deseada.

A menos que se indique de otra manera la expresión “anticuerpo multivalente” se usa a lo largo de esta memoria descriptiva para indicar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. Preferentemente, el anticuerpo multivalente se modifica genéticamente para que tenga tres o más sitios de unión a antígeno y generalmente no es un anticuerpo de IgM o IgA de secuencia nativa.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden solo una parte de un anticuerpo intacto, incluyendo generalmente un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y por lo tanto conservando la capacidad de unirse al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluidos en la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más restos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene los dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene los dominios VH y CH1 y uno o más restos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un brazo sencillo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (vii) las regiones CDR aisladas; (viii) los fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, Fv monocatenario; scFv) (Bird *et al.*, Science 242: 423-426 (1988); y Huston *et al.*, PNAS (EE.UU.) 85: 5879-5883 (1988)); (x) “diacuerpos” con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 6444-6448 (1993)); (xi) “anticuerpos lineales” que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995); y Patente de Estados Unidos N° 5.641.870).

La expresión “anticuerpo monoclonal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales que se dirigen contra un solo antígeno son muy específicos. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen distintos anticuerpos que se dirigen contra distintos determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención deben estar constituidos por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o también deben constituirse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) o en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos que derivan de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o de las cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que estos exhiban la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad, y capacidad deseada. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos no humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha realizado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos, como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye

- específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos no humanos de unión a antígeno. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una fagoteca, donde la fagoteca expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.* Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996); Sheets *et al.* PNAS (EE.UU.) 95: 6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, en ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcialmente o completamente. Tras la estimulación se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación génica, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos.
- Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995). Como alternativa, el anticuerpo humano se puede preparar mediante inmortalización de linfocitos B humanos produciendo un anticuerpo que se dirige contra un antígeno diana (dichos linfocitos B deben recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991); y Patente de Estados Unidos N° 5.750.373.
- El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente de la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye igualmente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Esta se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables ambos en los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina beta, conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA).
- La expresión "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Servicio Público de Salud, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de "un bucle hipervariable" (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Los restos de la "Región Marco Conservada" o "FR" son aquellos restos del dominio variable que son distintos de los restos de la región hipervariable tal como se define en el presente documento.
- Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de estas pueden dividirse adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1 (incluyendo los alotipos no A y A), IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ respectivamente. Las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.
- Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a una de dos tipos claramente distintos, denominados (κ) y (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- La expresión "región Fc" se usa para definir la región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede generarse por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana habitualmente se define por un tramo desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición Cys226, o aproximadamente en la posición Pro230, hasta el extremo carboxilo de la región Fc. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y adicionalmente comprende un dominio CH4.
- Por "cadena de la región Fc" en el presente documento significa una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.

5 El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también citado como dominio "C γ 2") normalmente se extiende desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 231 a un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 340. El dominio CH2 es único en tanto no se empareja estrechamente con ningún otro dominio. En lugar de ello, las dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG intacta nativa. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985). El dominio CH2 del presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa o un dominio CH2 variante.

10 El "dominio CH3" comprende el tramo de restos C terminales hasta un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 341 a un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 447 de una IgG). La región CH3 del presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida en una cadena del mismo y una "cavidad" correspondiente introducida en la otra cadena del mismo; véase la Patente de Estados Unidos N° 5.821.333). Dichos dominios CH3 variantes pueden usarse para preparar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) tal como se describe en el presente documento.

20 La "región bisagra" se define generalmente como un tramo de desde aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, a aproximadamente Pro230 de la IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol.22: 161-206 (1985)) Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína formando enlaces S-S dentro de las cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra del presente documento puede ser una región bisagra de secuencia nativa o región bisagra variante. Las dos cadenas polipeptídicas de una región bisagra variante generalmente conservan al menos un resto de cisteína por cadena polipeptídica, de modo que las dos cadenas polipeptídicas de la región bisagra variante pueden formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferida del presente documento es una región bisagra humana de secuencia nativa, por ejemplo, una región bisagra de IgG1 humana de secuencia nativa.

30 Una "región Fc funcional" posee al menos una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" a modo de ejemplo incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (CCDA); la fagocitosis; la regulación negativa de los receptores de superficie (por ejemplo el receptor de células B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren de la región Fc para combinarse con un dominio de unión (por ejemplo un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de los anticuerpos.

35 Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. La Figura 3 proporciona secuencias de aminoácidos de regiones Fc de IgG humana y murina de secuencia nativa

40 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa debido a al menos una modificación de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante del presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia con los mismos, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia con los mismos.

50 "La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "CCDA" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, células destructoras naturales (NK, *Natural Killer*), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el antígeno unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la CCDA, células NK, solamente expresan Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad CCDA de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo *in vitro* de CCDA, tal como el descrito en las Patentes de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y células destructoras naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad CCDA de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes *et al.* PNAS (EE.UU.) 95: 652-656 (1998).

65 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la función efectora CCDA. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la CCDA incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), células

destructoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las CMSP y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o de las CMSP tal como se describe en el presente documento.

5 La expresión "receptor de Fc" y el término "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares
10 que se diferencian principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (MATI) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (revisado en Daéron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y en de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identificarán en el futuro, están incluidos en el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es el responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976); y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

20 La "citotoxicidad dependiente de complemento" y "CDC" se refiere a la lisis de una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión de primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que forma un complejo con un antígeno fin. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo, como el que se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

25 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR de las mismas, que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) describen la maduración por afinidad por transposición del dominio VH y VL. La mutagénesis al azar de las CDR y/o de los restos marco conservados se describe por: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci., EE.UU.* 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

35 En el presente documento el "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después del alineamiento de las secuencias y de la introducción de huecos, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna de las sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede realizar de varias maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (ADNSTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquiera de los algoritmos necesarios para alcanzar el máximo alineamiento a lo largo de las secuencias de longitud completa que se comparan. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen tal como se describirá a continuación usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 autorizado por Genentech, Inc. se ha presentado junto con documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D. C., 20559, donde se ha registrado con el N° de Registro de Derechos de Autor TXU510087, y está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., San Francisco Sur, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D. digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

55 Para los fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada con respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos B determinada (que como alternativa puede redactarse como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o que comprende un % de identidad de secuencia de aminoácidos determinado con respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos B determinada), se calcula del siguiente modo:

60

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

65 en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en ese alineamiento de A y B del programa, y en la que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de aminoácidos de la secuencia A no es igual a

la longitud de aminoácidos de la secuencia B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al porcentaje de secuencia de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

Una "cadena polipeptídica" es un polipéptido en el que cada uno de los dominios de la misma se une al otro o a los otros dominios mediante uno o más enlaces peptídicos, en lugar de mediante interacciones no covalentes o enlaces disulfuro.

Un "enlazador flexible" en el presente documento se refiere a un péptido que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos por uno o más enlaces peptídicos, y que proporciona mayor libertad rotacional para dos polipéptidos (tal como dos regiones Fd) unidos por los mismos. Dicha libertad rotacional permite que dos o más sitios de unión a antígeno se unan más eficazmente mediante el enlazador flexible a cada uno de los accesos del antígeno o antígenos diana. Los ejemplos secuencias peptídicas de enlazadores flexibles adecuadas incluyen gly-ser, gly-ser-gly-ser (SEQ ID NO: 10), ala-ser, y gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO: 11). Preferentemente el enlazador flexible comprende de 2 a aproximadamente 10 restos de aminoácidos, y más preferentemente cuatro restos o menos.

Un "dominio de dimerización" se forma por la asociación de al menos dos restos de aminoácidos (generalmente restos de cisteína) o de al menos dos péptidos o polipéptidos (que pueden tener las misma, o distintas, secuencias de aminoácidos). Los péptidos o polipéptidos pueden interaccionar entre sí a través de asociación o asociaciones covalentes y/o no covalentes. Los ejemplos de dominios de dimerización del presente documento incluyen una región Fc; una región bisagra, un dominio CH3; un dominio CH4; un par CH1-CL; una "interfaz" con una "prominencia" y/o "protuberancia" modificada por ingeniería genética, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.821.333; una cremallera de leucina (por ejemplo una cremallera de leucina jun/fos, véase Kostelney *et al.*, J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992); o una cremallera de leucina GCN4 de levaduras); una cremallera de isoleucina; un par dímero-receptor (por ejemplo, receptor de interleucina 8 (IL-8R); y heterodímeros de integrina tales como LFA-1 y GPIIb/IIIa), o la región o regiones de dimerización de los mismos; polipéptidos de ligandos diméricos (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); véase Arakawa *et al.* J. Biol. Chem. 269(45): 27833-27839 (1994) y Radziejewski *et al.* Biochem. 32(48): 1350 (1993)), o la región o regiones de dimerización de los mismos; un par de restos de cisteína capaces de formar un puente disulfuro; un par de péptidos o polipéptidos, comprendiendo cada uno de ellos al menos un resto de cisteína (por ejemplo, de aproximadamente uno, dos o tres a aproximadamente diez restos de cisteína) de tal manera que el enlace o enlaces disulfuro pueden formarse entre los péptidos o polipéptidos (de aquí en adelante "una bisagra sintética"); y dominios variables de anticuerpo. El dominio de dimerización más preferido del presente documento es una región Fc o una región bisagra.

Los "restos de aminoácidos de origen natural" (*es decir*, restos de aminoácidos codificados por el código genético) pueden seleccionarse del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val). Un "resto de aminoácido que no es de origen natural" se refiere a un resto, distinto de los restos de aminoácidos de origen natural indicados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente al resto (o restos) en una cadena polipeptídica. Los ejemplos que restos de aminoácidos que no son de origen natural incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros restos de aminoácidos análogos tales como los descritos en Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991). Para generar dichos restos de aminoácidos que no son de origen natural, se pueden usar los procedimientos de Noren *et al.* Science 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, citado anteriormente. Brevemente, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt supresor con un resto de aminoácido que no es de origen natural seguido de la transcripción y traducción *in vitro* del ARN.

Un polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden inducir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos y no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará a un grado (1) mayor del 95 % en peso de polipéptido, tal como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente a un grado mayor del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. Sin embargo, habitualmente el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un "sitio de unión a antígeno funcional" de un anticuerpo es uno que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de unión a antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesariamente tan fuerte como la del anticuerpo parental del cual deriva el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad para unir el antígeno debe ser medible usando cualquiera de varios métodos conocidos para evaluar la unión de un anticuerpo con un antígeno. Además, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente del

presente documento no es necesariamente la misma desde un punto de vista cuantitativo. Para los anticuerpos multiméricos del presente documento, el número de sitios de unión a antígeno funcionales puede evaluarse usando el análisis de ultracentrifugación tal como se describe en el Ejemplo 2 a continuación. De acuerdo con este método de análisis, se combinan distintas proporciones de antígeno diana con respecto al anticuerpo multimérico y se calcula el peso molecular promedio de los complejos suponiendo diferentes números de sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos para evaluar el número de sitios de unión funcionales.

Por "activación de un receptor por ligando" se refiere a la traducción de señales (por ejemplo para un receptor de tirosina quinasa, que está causada por un dominio quinasa intracelular de un receptor de tirosina quinasa que fosforila los restos de tirosina quinasa en el receptor o un polipéptido sustrato) mediada por la unión al receptor por ligando (o a un complejo receptor que comprende el receptor de interés). En el caso de un receptor de ErbB, generalmente, esto implicará la unión de un ligando de ErbB con un hetero-oligómero de ErbB que activa un dominio quinasa de uno o más de los receptores de ErbB en el hetero-oligómero y por lo tanto da como resultado la fosforilación de los restos de tirosina en uno o más de los receptores de ErbB y/o la fosforilación de restos de tirosina en uno o más polipéptidos sustrato adicionales.

Una anticuerpo que "bloquea" la activación del ligando de un receptor es uno que reduce o impide dicha activación tal como se define anteriormente en el presente documento. Dicho bloqueo puede ocurrir por cualquier medio, por ejemplo, interfiriendo con: la unión del ligando con el receptor, la formación de complejos receptores, la actividad tirosina quinasa de un receptor de tirosina quinasa en un complejo receptor y/o la fosforilación de uno o más restos de tirosina quinasa en o por el receptor. Los ejemplos de anticuerpos que bloquean la activación del ligando de un receptor de ErbB incluyen los anticuerpos monoclonales 2C4 y 7F3 (que bloquean la activación de HRG de los hetero-oligómeros HER2/HER3 y HER2/HER4; y la activación de EGF, de TGF-beta o de la anfiregulina de un hetero-oligómero GFR/HER2); y los anticuerpos L26, L96 y L288 (Klapper *et al.* Oncogene 14: 2099-2109 (1997)), que bloquean la unión de EGF y NDF con células T47D que expresan EGFR, HER2, HER3 y HER4.

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo específico es uno que posee una o más de las características biológicas de este anticuerpo que lo diferencia de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* y/o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de la fase G1 y de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL® e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la fase G1 también actuarán sobre la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13.

Los ejemplos de anticuerpos anti-HER2 "inhibidores de crecimiento", son aquellos que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. Los anticuerpos anti-HER2 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células de tumor mamario SKBR3 en cultivos celulares en más del 20 %, y preferentemente en más del 50 % (por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %) a una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, donde la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SKBR3 al anticuerpo (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.677.171 expedida el 14 de octubre de 1997).

Un anticuerpo que "induce la muerte celular", es uno que hace que una célula viable se convierta en inviable. La célula es generalmente una que expresa el antígeno al cual se une el anticuerpo, especialmente cuando la célula sobreexpresa el antígeno. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de mama, de ovario, de estómago, de endometrio, de glándula salivar, de pulmón, de riñón, de colon, de tiroides, de páncreas o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular *in vitro* puede determinarse en ausencia del complemento y de células inmunitarias efectoras para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (CCDA) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por lo tanto, el ensayo para la muerte celular puede realizarse usando suero termo inactivado (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células inmunitarias efectoras. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de integridad de la membrana se evaluó por captación de yoduro de propidio (PI), azul tripano (véase Moore *et al.* Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) o la 7AAD puede evaluarse en relación a las células no tratadas.

Un anticuerpo que “induce la apoptosis” es uno que induce la muerte celular programada, tal como se determina por la unión de la anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es una que expresa el antígeno al cual se une el anticuerpo y puede ser una que sobreexpresa el antígeno. La célula puede ser una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, de ovario, de estómago, de endometrio, de glándula salivar, de pulmón, de riñón, de colon, de tiroides, de páncreas o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Hay diversos métodos disponibles para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (FS) puede medirse por unión a la anexina; la fragmentación del ADN puede evaluarse a través del escalonamiento del ADN tal como se divulga en el ejemplo del presente documento, y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación del ADN puede evaluarse por cualquier aumento de las células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce apoptosis es uno que produce una inducción de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 veces, y más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 veces, de la unión de anexina respecto a células no tratadas en un ensayo de unión a anexina usando células que expresan el antígeno al que se une el anticuerpo.

Los ejemplos de anticuerpos que inducen la apoptosis incluyen anticuerpos monoclonales anti-HER2 7F3 (ATCC HB-12216), y 7C2 (ATCC HB 12215), incluyendo variantes humanizadas y/o maduras por afinidad de los mismos; los anticuerpos anti-DR5 3F11.39.7 (ATCC HB-12456); 3H3.14.5 (ATCC HB-12534); 3D5.1.10 (ATCC HB-12536); y 3H3.14.5 (ATCC HB-12534), incluyendo variantes humanizadas y/o maduras por afinidad de los mismos; los anticuerpo anti-receptores de DR5, 16E2 y 20E6, incluyendo variantes maduras por afinidad de los mismos (documento WO98/51793); los anticuerpos anti-DR4 4E7.24.3 (ATCC HB-12454); 4H6.17.8 (ATCC HB-12455); 1H5.25.9 (ATCC HB-12695); 4G7.18.8 (ATCC PTA-99); y 5G11.17.1 (ATCC HB-12694), incluyendo variantes humanizadas y/o maduras por afinidad de los mismos.

Para explorar anticuerpos que se unan a un epítipo o a un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo rutinario de bloqueo cruzado tal como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

Un “anticuerpo agonista” es un anticuerpo que se une a y activa un receptor. Generalmente, la capacidad de activación del receptor del anticuerpo agonista será al menos cualitativamente similar (y puede ser esencialmente cuantitativamente similar) al de un ligando agonista nativo del receptor. Un ejemplo de un anticuerpo agonista es uno que se une a un receptor en la superfamilia de receptores de TNF e induce la apoptosis de células que expresan el receptor de TNF. Los ensayos para la determinación de la inducción de la apoptosis se describen en los documentos WO98/51793 y WO99/37684.

Un “trastorno” es cualquier afección que pueda beneficiarse de tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, que incluyen aquellos estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y neoplasias tumorales linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrófágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, ralentizar hasta algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta algún grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta algún grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta algún grado uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Con respecto al grado en el que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo*, puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad (TPE) y/o determinando las tasas de respuesta (TR).

“Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos pacientes que necesiten tratamiento incluyen a aquellos pacientes que ya tienen el trastorno, así como a aquellos en los que se impedirá que se produzca el trastorno.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Una "enfermedad autoinmunitaria" en el presente documento es una enfermedad o trastorno no maligno que surge de y se dirige contra los propios tejidos de un individuo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias cutáneas que incluyen la psoriasis y la dermatitis (por ejemplo dermatitis atópica); escleroderma y esclerosis sistémica; respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de distrés respiratorio (incluyendo síndrome de distrés respiratorio del adulto; SDRA); dermatitis, meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma y otras afecciones que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión leucocitaria; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (*por ejemplo*, diabetes mellitus de Tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmunitaria; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjorgen; diabetes de aparición juvenil; y respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T que normalmente se encuentran en, tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapédesis leucocitaria; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de daño multiorgánico; anemia hemolítica (incluyendo, pero sin limitación, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia grave; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad antiglomerular de la membrana basal; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide ampolloso; penfigoide; poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad de Reiter; síndrome del hombre rígido; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis del complejo inmunitario; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) o trombocitopenia autoinmunitaria, etc.

Por "antígeno extraño" se entiende una molécula o moléculas que no son endógenas o nativas de un mamífero expuesto al mismo. El antígeno extraño puede suscitar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta humoral y/o mediada por células T en el mamífero. Generalmente el antígeno extraño provocará la producción de anticuerpos frente al mismo. Los ejemplos de antígenos extraños contemplados en el presente documento incluyen agentes terapéuticos inmunogénicos, por ejemplo proteínas tales como anticuerpos, particularmente anticuerpos que comprenden restos de aminoácidos no humanos (por ejemplo anticuerpos de roedores, quiméricos/humanizados y primatizados); toxinas (opcionalmente conjugadas a una molécula dirigida tal como un anticuerpo, en el que la molécula dirigida también puede ser inmunogénica); vectores virales de terapia génica, tales como retrovirus y adenovirus, injertos; agentes infecciosos (por ejemplo bacterias y virus); aloantígenos (es decir un antígeno que se da en algunos, pero no en otros miembros de la misma especie) tales como diferencias en los grupos sanguíneos, antígenos humanos linfocitarios (HLA), antígenos plaquetarios, antígenos expresados en órganos trasplantados, componentes sanguíneos, factores de gestación (Rh) y hemofílicos (por ejemplo, el Factor VIII y Factor IX).

Por "bloquear una respuesta inmunitaria" contra un antígeno extraño se entiende reducir o prevenir al menos una respuesta mediada por el sistema inmunitario resultante de la exposición a un antígeno extraño. Por ejemplo, se puede atenuar una respuesta humoral contra el antígeno extraño, es decir, previniendo o reduciendo la producción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno en el mamífero. Como alternativa, o adicionalmente, se puede suprimir un idiotipo, "apaciguar" la eliminación de células recubiertas aloanticuerpos; y/o afectar a la presentación de aloantígenos a través del empobrecimiento de células presentadoras de antígeno.

El término "injerto" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material biológico procedente de un donante para el trasplante a un receptor. Los injertos incluyen diversos materiales tales como, por ejemplo, células aisladas tales como células de los islotes, tejidos tales como la membrana amniótica de un recién nacido, médula ósea, células hematopoyéticas precursoras; y tejido ocular, tal como tejido de córnea, y órganos tales como piel, corazón, riñón, bazo, páncreas, lóbulo tiroideo, pulmón, riñón, órganos tubulares (por ejemplo, intestino, vasos sanguíneos, o esófago), etc. Los órganos tubulares se pueden usar para reemplazar partes dañadas de esófago, vasos sanguíneos, o conducto biliar. Los injertos de piel se pueden usar no solamente para quemaduras, sino también para proteger el intestino dañado o para cerrar determinados defectos tales como la hernia diafragmática. El injerto procede de cualquier fuente de mamíferos, incluyendo seres humanos, ya sea de cadáveres o de donantes vivos. Preferentemente el injerto es de médula ósea o de un órgano, tal como el corazón y los antígenos HLA de clase II del donante del injerto y del hospedador coinciden.

La expresión "hospedador mamífero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier receptor de trasplante compatible. Por "compatible" se entiende un hospedador mamífero que aceptará el injerto donado. Preferentemente, el hospedador es un ser humano. Tanto si el donante del injerto como el hospedador son humanos, preferentemente sus antígenos HLA de clase II coinciden de modo que mejora la histocompatibilidad.

El término "donante" tal como se usa en el presente documento se refiere a especies de mamíferos, vivos o muertos, de los cuales procede el injerto. Preferentemente, el donante es un ser humano. Los donantes humanos son preferentemente donantes voluntarios con grupo sanguíneo relacionado que son normales en el examen físico y del mismo grupo sanguíneo ABO principal, ya que el cruce de barreras en el grupo sanguíneo principal posiblemente perjudica a la supervivencia del aloinjerto. Sin embargo, es posible trasplantar, por ejemplo, un riñón de un donante de tipo O en un receptor de tipo A, B o AB.

El término "trasplante" y variaciones del mismo se refieren a la inserción de un injerto en un hospedador, tanto si el

trasplante es singénico (cuando el donante y el receptor son genéticamente idénticos), alogénico (cuando el donante y el receptor son de distintos orígenes genéticos pero de la misma especie) o xenogénico (cuando el donante y el receptor son de distintas especies). Por lo tanto, en un escenario típico, el hospedador es un ser humano y el injerto es un isoinjerto, procedente de un ser humano del mismo o distinto origen genético. En otro escenario, el injerto

5 procede de una especie distinta de la que va a ser trasplantada, tal como un corazón de babuino trasplantado en un hospedador receptor humano, e incluye animales de especies filogenéticamente muy separadas, por ejemplo, una válvula de corazón porcino, o células animales beta de los islotes o células neuronales trasplantadas en un hospedador humano.

10 La expresión “desensibilizar a un mamífero en espera de un trasplante” se refiere a reducir o anular la sensibilidad alérgica o reactividad a un trasplante, antes de la administración del trasplante al mamífero. Esto puede llevarse a cabo por cualquier mecanismo, tal como una reducción de los anticuerpos anti-donante en el mamífero desensibilizado, por ejemplo, donde dichos anticuerpos anti-donante se dirigen contra el antígeno linfocitario humano (HLA).

15 La expresión “agente citotóxico” tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo Al^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aciridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilenaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adocolesina, carcelesina y bicelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de clorhidrato de mecloretamina, melfalán, novembichin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como el antibiótico enediyna (por ejemplo caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ_1^1 y caliqueamicina θ_1^1 , véase por ejemplo, Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186

25 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína cromoproteína relacionados), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; sustitutos del ácido fólico tales como ácido frolnico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbicina; PSK®; razoxano; rizoxin; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaciuona; 2, 2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A yanguidina); uretano; vindesina; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de las anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en los tumores tales como los anti estrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, imidazoles 4(5) inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente

65 aceptables.

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas dentro de las citocinas están las hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, la hormona del crecimiento humana N-metionil, y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina, prorrelaxina; hormonas glucoproteicas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH) y hormona lutenizante (LH); el factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor alfa y beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a la gonadotropina murina; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-alfa; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

El término "profármaco", tal como se usa en esta solicitud, se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y que puede activarse o convertirse enzimáticamente en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, páginas 375-382, 615º Congreso de Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ediciones), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotáxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profarmacológica para su uso en esta invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un "factor angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos. En el presente documento el factor angiogénico preferido es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF).

Cuando en el presente documento se usa la palabra "marcador", se refiere a un compuesto o a una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. El marcador puede ser en sí mismo detectable (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia normalmente en la fuente natural del ácido nucleico polipeptídico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas por lo tanto se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan el polipéptido donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

El ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está ligado operativamente al ADN para un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está ligado operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de modo que facilite la traducción. Generalmente, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo los potenciadores no tienen que estar contiguos. El ligamiento se realiza ligando en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se usa en el presente documento, los términos y expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las designaciones incluyen la descendencia. Por lo tanto, las palabras "transformantes"

y “células transformadas” incluyen las células primarias del sujeto y los cultivos derivados de las mismas sin importar el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no tener un contenido de ADN precisamente idéntico, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica, tal como se explora para las células originalmente transformadas.
5 Cuando se pretendan distintas designaciones, será claro a partir del contexto.

II. Modos para llevar a cabo la invención

A. Anticuerpos multivalentes

10 La invención del presente documento se refiere a un método para preparar un anticuerpo multivalente. Más adelante en la presente solicitud se describirán diversas técnicas para generar el anticuerpo “parental” o “inicial” a partir del cual puede derivar el/los dominios variable (variables) del anticuerpo multivalente.

15 El anticuerpo multivalente de particular interés en el presente documento es uno que comprende cuatro o más sitios de unión a antígeno. Generalmente, todos los sitios de unión a antígeno son “funcionales” tal como se define anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el anticuerpo multivalente no existe en la naturaleza y no es anticuerpo de IgM o IgA de secuencia nativa. Preferentemente, el anticuerpo multivalente del presente documento no se produce *in vitro* entrecruzando químicamente un par de anticuerpos (por ejemplo, como en Ghetie *et al.* (1997), citado anteriormente o en Wolff *et al.* (1993), citado anteriormente). La presente solicitud también proporciona anticuerpos multivalentes que no requieren la introducción de uno o más restos de cisteína en un anticuerpo parental para fabricar el anticuerpo multivalente mediante uno o más enlaces disulfuro entre un par de regiones Fc (por ejemplo tal como en Shopes *et al.* (1992), citado anteriormente o Caron *et al.* (1992), citado anteriormente).
20

25 La primera cadena polipeptídica comprende dos dominios variables de cadena pesada y la segunda cadena polipeptídica también comprende dos dominios variables de cadena pesada, que pueden combinarse con dominios variables de cadena ligera correspondientes (al menos dos para cada cadena polipeptídica) para generar cuatro o más sitios de unión a antígeno.

30 El anticuerpo multivalente comprende una región Fc (por ejemplo, una secuencia nativa o región Fc variante). La región Fc es preferentemente “funcional” tal como se define anteriormente en el presente documento y por lo tanto es capaz de realizar una o más funciones efectoras del anticuerpo, tales como la CCDA o la CDC. Preferentemente, el anticuerpo multivalente tiene solamente una región Fc.

35 Los cuatro o más sitios de unión a antígeno están provistos de un extremo amino en la región Fc (en lugar de en el extremo carboxilo de la región Fc tal como en Coloma y Morrison, (1997) citado anteriormente). Esto puede realizarse proporcionando una primera cadena polipeptídica representada por la fórmula VD1-X1-VD2-X2-Fc, en la que (1) VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada o ligera (preferentemente un dominio variable de cadena pesada), (2) VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada o cadena ligera (preferentemente un dominio variable de cadena pesada), (3) Fc comprende una cadena de una región Fc, y (4) X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido adicional interviniente. El enlazador flexible puede comprender un péptido tal como gly-ser, gly-ser-gly-ser (SEQ ID NO: 10), ala-ser o gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO: 11).
40

45 El anticuerpo multivalente comprende cuatro o más polipéptidos Fab, cada uno de ellos capaz de unir un antígeno. Los fragmentos Fab se proporcionan amino terminales a la región Fc (donde el anticuerpo multivalente tiene una región Fc). Por ejemplo, dos o más fragmentos Fd pueden fusionarse al extremo amino de una cadena de una región Fc. La cadena polipeptídica así modificada por ingeniería genética puede combinarse con (1) otra cadena polipeptídica formada por dos o más fragmentos Fd fusionados al extremo amino de la otra cadena de la región Fc, así como (2) dominios VL complementarios (por ejemplo cuatro o más dominios VL cada uno de los cuales, opcionalmente, se fusionan con un dominio CL). Opcionalmente, el anticuerpo comprende un enlazador flexible entre los dos o más fragmentos Fd.
50

55 Cada uno de los cuatro o más sitios de unión a antígeno funcionales del anticuerpo multivalente del presente documento está formado preferentemente por un dominio variable de cadena pesada y ligera. Por lo tanto, cuando dos o más dominios variables de cadena pesada se fusionan conjuntamente (opcionalmente con uno o más restos de aminoácidos intervinientes, como se indica anteriormente), dos o más polipéptidos complementarios que contienen dominios variables de cadena ligera se combinan con los dominios variables de cadena pesada (por ejemplo coexpresando la proteína de fusión y el polipéptido o polipéptidos del dominio variable de cadena ligera en la misma célula hospedadora). El anticuerpo comprende cuatro o cinco o más (por ejemplo hasta aproximadamente 8) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera, cada uno de ellos comprendiendo, opcionalmente, un dominio CL.
60

65 En una realización del presente documento, el anticuerpo con cuatro o más sitios de unión a antígeno puede comprender una cadena polipeptídica que comprende cuatro o más dominios variables de cadena pesada o de cadena ligera, en los que cada uno de los dominios variables se combina con, o se asocia con, cuatro o más

polipéptidos de dominio variable de cadena ligera o de cadena pesada de tal modo que forman los sitios de unión a antígeno. Por lo tanto, cuando la cadena polipeptídica comprende cuatro o más dominios variables de cadena pesada, esta se combina o se asocia con cuatro o más polipéptidos de dominio variable de cadena ligera correspondientes (por ejemplo con polipéptidos VL-CL). Como alternativa, cuando la cadena polipeptídica comprende cuatro o más dominios variables de cadena ligera, esta se combina o se asocia con cuatro o más polipéptidos de dominio variable de cadena pesada correspondientes (por ejemplo con polipéptidos VH-CH1). Preferentemente cada uno de los cuatro o más sitios de unión a antígeno se dirige contra el mismo antígeno. Los ejemplos de antígenos unidos por dichos anticuerpos incluyen (1) un receptor de la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) tal como DR4 y DR5; (2) un antígeno de superficie de células B tal como CD20; (3) un receptor de ErbB ilustrado por el receptor de HER2; o (4) una proteína de superficie celular expresada por células tumorales. Por ejemplo, la cadena polipeptídica puede comprender cuatro dominios variables de cadena pesada que son capaces de combinarse con cuatro polipéptidos de dominio variable de cadena ligera (preferentemente polipéptidos VL-CL) para generar cuatro sitios de unión a antígeno dirigidos contra el mismo antígeno. Dichos anticuerpos se ilustran por los representados en la Figura 23D (con cuatro sitios de unión a antígeno) y en la Figura 23E (con cuatro sitios de unión a antígeno).

Los anticuerpos multivalentes del presente documento tienen propiedades deseables particularmente para la terapia y diagnóstico *in vivo*. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente puede internalizarse y catabolizarse por una célula que expresa un antígeno, al cual se une el anticuerpo, más rápido que un anticuerpo bivalente. Por lo tanto, la invención proporciona un inmunoc conjugado que comprende el anticuerpo multivalente conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo uno que es activo destruyendo las células una vez que se ha internalizado). En el presente documento se describen diversos agentes citotóxicos para generar un inmunoc conjugado, pero el agente citotóxico preferido es un isótopo radiactivo, un maitansinoide o una caliqueamicina.

El anticuerpo multivalente, y/o un anticuerpo parental del cual se derivan al menos las especificidades de unión a antígeno del anticuerpo multivalente, pueden tener determinadas propiedades. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente y/o anticuerpo parental puede (1) ser un anticuerpo agonista (por ejemplo, cuando un antígeno que se une al anticuerpo es un receptor de la familia de receptores de TNF o un antígeno de superficie de células B); (2) inducir la apoptosis (por ejemplo, cuando un antígeno que se une al anticuerpo es un receptor de ErbB o un receptor de la superfamilia de receptores de TNF); (3) unirse a una proteína de la superficie celular (tal como un antígeno de la superficie de una célula B o un receptor de ErbB) expresado en células tumorales; (4) unirse a una proteína de la superficie celular (por ejemplo, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), receptor de HER2, receptor de ErbB3, receptor de ErbB4, o receptor de DcR3) sobreexpresada por células tumorales; y/o (5) ser un anticuerpo inhibidor del crecimiento.

El anticuerpo multivalente del presente documento tiene especificidad solamente por un antígeno, o por más de un antígeno (por ejemplo, de dos a aproximadamente tres antígenos). En una realización, los tres o más sitios de unión a antígeno funcionales del anticuerpo multivalente pueden unirse todos al mismo antígeno (preferentemente al mismo epítipo en ese antígeno, en cuyo caso el anticuerpo multivalente podría considerarse "monoespecífico"). Esta solicitud también proporciona anticuerpos "multiespecíficos". Por lo tanto, los tres o más sitios de unión a antígeno funcionales pueden unirse a dos o más (por ejemplo, de dos a aproximadamente tres) antígenos o epítipos diferentes.

La presente solicitud muestra que un anticuerpo multivalente dirigido contra un antígeno receptor puede manipularse por ingeniería genética que, sorprendentemente, tiene capacidad agonista y/o inductora de apoptosis que es cuantitativamente similar a la del ligando nativo. Por "cuantitativamente similar" en el presente documento se entiende que, en un ensayo que determina la actividad agonista y/o inductora de apoptosis, el anticuerpo multivalente tiene una actividad de aproximadamente diez veces, y preferentemente de aproximadamente cinco veces la actividad agonista y/o inductora de apoptosis del ligando nativo. En esta realización, el ligando con actividad agonista y/o inductora de apoptosis puede ser uno con especificidad por un receptor de la superfamilia de receptores de TNF, por ejemplo, un receptor de Apo2L tal como DR4, DR5, DcR1 y DcR2 (preferentemente DR4 o DR5), en cuyo caso la actividad del anticuerpo en un ensayo de apoptosis, tal como se describe en el Ejemplo 3 más adelante, es de aproximadamente diez veces, por ejemplo, de aproximadamente cinco veces, la actividad de Apo2L en ese ensayo.

El anticuerpo multivalente del presente documento puede, en una realización de la invención, unirse a un antígeno de la superficie de una célula B. Los antígenos preferentes de la superficie de una célula B incluyen CD19, CD20, CD22 y CD40, y más preferentemente CD20.

Se contemplan y se describen diversas aplicaciones para los anticuerpos multivalentes del presente documento en más detalle a continuación. Cuando el anticuerpo multivalente posea una o más regiones Fc funcionales, se espera que tenga la capacidad de mediar funciones efectoras (tales como CCDA y CDC) y tenga una semivida más prolongada que la de los anticuerpos equivalentes que no tienen una región Fc. Dichos anticuerpos multivalentes pueden usarse para destruir células, tales como células tumorales o cancerosas, si se desea. Otras formas de los anticuerpos multivalentes del presente documento que no tienen una región Fc pueden ser deseables cuando se desea una semivida más corta (por ejemplo para tratar enfermedades o trastornos cardiovasculares o inflamatorios,

o cuando el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico); cuando se desea la internalización del anticuerpo (por ejemplo para la terapia con un inmunoc conjugado que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico); para la penetración mejorada de un tumor sólido; cuando se desea la expresión del anticuerpo multivalente en una célula hospedadora que no es de mamífero (por ejemplo una célula hospedadora procariota tal como una célula hospedadora de *E. coli*); para la terapia de enfermedades o trastornos no oncológicos, y/o para impedir el "efecto de la primera dosis" observado tras la administración de determinados anticuerpos que poseen una o más funciones efectoras en los pacientes. Dichas formas del anticuerpo pueden comprender un anticuerpo multivalente que incluya un dominio de dimerización, en el que el dominio de dimerización comprende una región bisagra de un anticuerpo fusionada a un dominio de cremallera de leucina (el dominio de cremallera de leucina facilita la asociación de los polipéptidos que forman el dominio de dimerización, pero puede eliminarse posteriormente de manera proteolítica antes de la administración a un paciente) (véase la Figura 23 C); un anticuerpo multivalente con tres sitios de unión a antígeno, tal como se muestra en la Figura 23D; o un anticuerpo multivalente con cuatro sitios de unión a antígeno tal como se representa en la Figura 23E.

15 B. Especificidad de unión a antígeno

El anticuerpo multivalente del presente documento se dirige contra, o se une específicamente con, uno o más antígenos diana. Preferentemente, al menos uno de los antígenos que se une al anticuerpo multivalente es un polipéptido de importancia biológica y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en este mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumores; véase la Patente de Estados Unidos 5.091.178).

Cuando el antígeno es un polipéptido, este puede ser una molécula de transmembrana (por ejemplo un receptor) o un ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos a modo de ejemplo incluyen moléculas tales como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; el factor de liberación de la hormona del crecimiento; la hormona paratiroidea; la hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular (FT), y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como la Proteína C; factor natriurético auricular; tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa o el activador del plasminógeno del tipo tisular (t-PA) o urinario humano; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor alfa y beta de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (regulada sobre la activación de células T normalmente expresada y secretada); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa); una seroalbúmina tal como la seroalbúmina humana; sustancia inhibidora Muleriana; la cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD25 (subunidad Tac del receptor de IL-2); eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogénica ósea (BMP); un interferón, tal como, interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; superóxido de dismutasa; receptores de células T; proteínas de superficie de membrana; factor acelerador de la degradación; antígenos virales, tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura del SIDA; proteínas transportadoras; receptores de retorno dirigido; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un ICAM, VLA-4 o VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como el receptor de HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriormente enumerados.

Las dianas moleculares preferidas para los anticuerpos incluidos en la presente invención incluyen marcadores de superficie leucocitarios o proteínas CD, tales como, CD1a-c, CD2, CD2R, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, C41, CD42a-d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD45A, CD45B, CD45O, CD46-CD48, CD49a-f, CD50, CD51, CD52, CD53-CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CDw65, CD66a-e, CD68-CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a-b, CD80-CD83, CDw84, CD85-CD89, CDw90, CD91, CDw92, CD93-CD98, CD99, CD99R, CD100, CDw101, CD102-CD106, CD107a-b, CDw108, CDw109, CD115, CDw116, CD117, CD119, CD120a-b, CD121a-b, CD122, CDw124, CD126-CD129, y CD130; miembros de la familia de receptores de ErbB tal como el receptor de EGF, el receptor de HER2, el receptor de HER3 o el receptor de HER4; antígeno (o antígenos) prostático específico; moléculas de adhesión celular, tales como, IIb/IIIa, LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina α 4/ β 7 e integrina α v/ β 3 incluyendo cualquiera de las subunidades α o β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales

como VEGF; factor tisular (FT); alfa interferón (α -IFN); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor de flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor de c-mpl; CTLA-4; proteína C etc.

5 Pueden usarse antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados a otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, fragmentos de estos (por ejemplo el dominio extracelular de un receptor) se pueden usar como el inmunógeno. Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembrana pueden usarse como el inmunógeno. Dichas células pueden proceder de una fuente natural (por ejemplo, de líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán obvios para los expertos en la materia.

15 Los antígenos diana preferidos para los anticuerpos multivalentes del presente documento incluyen (1) receptores de ErbB, incluyendo EGFR, HER2, HER3 y HER4; (2) receptores de la superfamilia de receptores de TNF, por ejemplo receptores de Apo2L, tales como DR4, DR5, DcR1 y DcR2; (3) antígenos de superficie de células B, especialmente CD19, CD20, CD22 y CD40; (4) antígenos expresados por células tumorales; (5) antígenos sobreexpresados por células tumorales (por ejemplo, receptores de ErbB; receptores de DcR3); (6) receptores activados por ligandos multiméricos (por ejemplo diméricos o triméricos) (por ejemplo receptores de la superfamilia de receptores de TNF; receptores de VEGF, etc.). En una realización, tres o más (por ejemplo de cuatro a aproximadamente ocho) sitios de unión a antígeno del anticuerpo multivalente pueden dirigirse todos contra el mismo determinante antigénico o epítipo en uno de los antígenos anteriores.

25 La presente solicitud también proporciona anticuerpos multiespecíficos, es decir, anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos o determinantes antigénicos diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos; BsAbs) tienen un potencial significativo en una amplia variedad de aplicaciones clínicas como agentes diana para el inmunodiagnóstico y la terapia *in vitro* e *in vivo*, y para inmunoensayos de diagnóstico.

30 Los anticuerpos biespecíficos han sido muy útiles para explorar las propiedades funcionales de las moléculas de la superficie celular y en la definición de la capacidad de los diferentes receptores de Fc para mediar citotoxicidad (Fanger *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 12: 101-124 (1992)). Nolan *et al.*, Biochem. Biophys. Acta. 1040: 1-11 (1990) describen otras aplicaciones diagnósticas para los BsAbs. En particular, los BsAbs pueden construirse para inmovilizar enzimas para su uso en inmunoensayos enzimáticos. Para realizar esto, puede diseñarse un brazo del BsAbs que se una a un epítipo específico de la enzima de modo que la unión no cause la inhibición de la enzima, uniéndose el otro brazo del BsAbs a la matriz de inmovilización garantizando que la enzima tenga una alta densidad en el sitio deseado. Los ejemplos de dichos BsAbs diagnósticos incluyen el BsAbs anti IgG/anti ferritina de conejo descrito por Hammerling *et al.*, J. Exp. Med. 128: 1461-1473 (1968) que se usó para localizar antígenos de superficie. También se han desarrollado BsAbs que tienen especificidades de unión por la Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) así como una hormona. Otra posible aplicación inmunoquímica de los BsAbs implica su uso en inmunoensayos de dos sitios. Por ejemplo, se producen dos BsAbs que se unen a dos epítopos distintos del analito de la proteína - un dos BsAbs une el complejo a una matriz insoluble, el otro se une a una enzima indicadora (véase Nolan *et al.*, citado anteriormente).

45 Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden usar para inmunodiagnósticos *in vitro* o *in vivo* de diversas enfermedades tales como cáncer (Songsivilai *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 79: 315 (1990)). Para facilitar este uso diagnóstico del BsAb, un brazo del BsAb puede unirse a un antígeno asociado a un tumor y el otro brazo puede unirse a un marcador detectable, tal como un quelante que se une estrechamente a un radionúclido. Usando este enfoque, Le Doussal *et al.* fabricaron un BsAb útil para la radioinmunodetección de carcinomas colorrectal y tiroideo que tenía un brazo que se unía al antígeno carcinoembrionario (CEA) y otro brazo que se unía al ácido dietilentriaminopentacético (DPTA). Véase Le Doussal *et al.*, Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62 (1992) y Le Doussal *et al.*, J. Nucl. Med. 34: 1662-1671 (1993). Stickney *et al.* describen de manera similar una estrategia para detectar cánceres colorrectales que expresan el CEA usando radioinmunodetección. Estos investigadores describen un BsAb que se une al CEA así como al hidroxietiltiourea-bencil-EDTA (EOTUBE). Véase Stickney *et al.*, Cancer Res. 51: 6650-6655 (1991).

55 Los anticuerpos multiespecíficos también pueden usarse para terapia humana en la citotoxicidad redirigida proporcionando un brazo que se une a una diana (por ejemplo, a un patógeno o a una célula tumoral) y otro brazo que se une a una molécula desencadenante citotóxica, tal como el receptor de células T o un receptor de Fc gamma. Por consiguiente, los anticuerpos multiespecíficos pueden usarse para dirigir un mecanismo de defensa inmunitario celular de un paciente específicamente contra la célula tumoral o el agente infeccioso. Usando esta estrategia, se ha demostrado que los anticuerpos biespecíficos que se unen a Fc gamma RIII (es decir, CD16) pueden actuar como mediadores en la destrucción de células tumorales por células destructoras naturales (NK)/células linfocíticas granulares grandes (LGG) *in vitro* y son eficaces para prevenir el crecimiento tumoral *in vivo*. Segal *et al.*, Chem. Immunol. 47: 179 (1989) y Segal *et al.*, Biologic Therapy of Cancer 2(4) DeVita *et al.* eds. J. B. Lippincott, Filadelfia (1992) página 1. De manera similar, se ha desarrollado un anticuerpo biespecífico que tenga un brazo que se una a Fc gamma RIII y otro que se una al receptor HER2 para la terapia de tumores de ovario y mama que sobreexpresan el antígeno HER2. (Hseih-Ma *et al.* Cancer Research 52: 6832-6839 (1992) y Weiner *et al.*

Cancer Research 53: 94-100 (1993)). Los anticuerpos específicos también pueden actuar como mediadores en la destrucción por células T. Normalmente, los anticuerpos biespecíficos unen el complejo CD3 de células T con un antígeno asociado a tumor. Un BsAb F(ab')₂ completamente humanizado que consiste en un anti-CD3 unido a anti-p185^{HER2} se ha usado para dirigir células T para destruir células tumorales que sobreexpresan el receptor HER2.

5 Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175(1): 217 (1992). Los anticuerpos biespecíficos se han ensayado en diversos estudios clínicos de fase temprana con resultados alentadores. En un estudio, se trataron 12 pacientes con cáncer de pulmón, de ovario o de mama con infusiones de linfocitos T activados dirigidos con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/anti-tumor (MOC31). deLeij *et al.* Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds., Lienhart (1991) página 249. Las células dirigidas indujeron una lisis local considerable de

10 células tumorales, una respuesta inflamatoria moderada, pero no tuvieron efectos secundarios tóxicos o respuestas frente al anticuerpo anti ratón. En un estudio muy preliminar de un anticuerpo biespecífico anti-CD3/anti-CD19 en un paciente con malignidad de células B, también se consiguió una reducción significativa en el recuento de células tumorales periféricas. Clark *et al.* Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds., Lienhart (1991) página 243. Véase también Kroesen *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 37: 400-407 (1993), Kroesen *et al.*, Br. J. Cancer 70: 652-661 (1994) y Weiner *et al.*, J. Immunol. 152: 2385 (1994) en lo que

15 concierne a aplicaciones terapéuticas para anticuerpos multiespecíficos.

Los anticuerpos multiespecíficos también pueden usarse como agentes fibrinolíticos o como adyuvantes de vacunas. Además, estos anticuerpos pueden usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas (por ejemplo para dirigir células efectoras contra células infectadas por virus, tales como el VIH o el virus de la gripe o protozoos tales como *Toxoplasma gondii*), pueden usarse para suministrar inmunotoxinas a las células tumorales, o para dirigir complejos inmunitarios a receptores de la superficie celular (véase Fanger *et al.*, citado anteriormente).

20

En el presente documento se contemplan diversos anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico puede unirse a dos o más epítopos diferentes en el antígeno de interés. Como alternativa, el anticuerpo multiespecífico puede tener especificidad por (1) un antígeno expresado por una célula diana (por ejemplo, donde la célula dirigida es una célula tumoral) y por (2) una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de célula T (por ejemplo CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (Fc gamma R), tales como Fc gamma RI (CD64), Fc gamma RII (CD32) y Fc gamma RIII (CD16) de modo que se focalicen los

25 mecanismos de defensa celular contra la célula que expresa el antígeno. Los anticuerpos multiespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos contra células que expresan el antígeno diana. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno diana y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo saporina, interferón alfa, alcaloide de la vinca, cadena de ricino A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo).

30

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-HER2/anti-Fc gamma RIII y la Patente de Estados Unidos N° 5.837.234 divulga un anticuerpo biespecífico anti-HER2/anti-Fc gamma RI. En el documento WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-HER2/Fc alfa. La Patente de Estados Unidos N° 5.821.337 explica un anticuerpo biespecífico anti-HER2/anti-CD3.

35

40 C. Preparación del anticuerpo parental

Para generar el anticuerpo multivalente, puede prepararse un anticuerpo "parental" o "inicial" con dominios variables dirigido contra un antígeno, usando diversas metodologías para fabricar anticuerpos, tales como las descritas anteriormente en el presente documento. Las secuencias de los dominios variables del anticuerpo inicial o parental

45 pueden usarse en el diseño del anticuerpo multivalente del presente documento.

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se suscitan preferentemente en los animales por inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de semilla de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R¹N=C=NR, donde R y R¹ son grupos alquilo diferentes.

50

55

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y se inyecta la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los animales reciben un refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde los animales se desangran y se somete a ensayo el título de anticuerpos en suero. Los animales reciben un refuerzo hasta que el título se estabiliza. Preferentemente, el animal recibe un refuerzo con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento distinto. Los conjugados también pueden prepararse en cultivos celulares recombinantes como proteínas de fusión. También, se usan agentes agregantes

60

65

tales como alumbre de manera adecuada para potenciar la respuesta inmunitaria.

(ii) Anticuerpos monoclonales

5 Los anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en menores cantidades. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos específicos.

10 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse usando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o puede fabricarse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

15 En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe anteriormente en el presente documento para suscitar linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente con la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

20 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

30 Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, mantienen altos niveles de producción estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como aquellas que derivan de tumores murinos MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Centro de Distribución de Células del Salk Institute, San Diego, California EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 35 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

40 El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

45 Después de identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

50 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero, mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

55 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo la proteína del anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión acerca de la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückerthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992). La expresión recombinante de los anticuerpos se describe en más detalle a continuación.

65 En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de

fagotecas de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando fagotecas. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por transposición de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir fagotecas muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de anticuerpos monoclonales de hibridoma, para el aislamiento de los anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humana en el lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un péptido que no sea de inmunoglobulina.

Normalmente dichos péptidos que no son de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación antigénica de un anticuerpo para crear un anticuerpo quimérico bivalente que comprende un sitio de combinación antigénica que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación antigénica que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanos

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden fabricarse mediante una adaptación del método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein usando, como compañeros de fusión, linfocitos B humanos. Los linfocitos B humanos que producen un anticuerpo de interés pueden, por ejemplo, aislarse de un individuo humano, tras obtener su consentimiento una vez informado. Por ejemplo, el individuo puede producir anticuerpos contra un autoantígeno, tal como ocurre en determinados trastornos, tales como, lupus eritematoso sistémico (Shoenfeld *et al.* J. Clin. Invest. 70: 205 (1982)), púrpura trombocitopénica mediada por el sistema inmunitario (PTI) (Nugent *et al.* Blood 70(1): 16-22 (1987)), o cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Por ejemplo, se pueden exponer linfocitos aislados de sangre periférica humana *in vitro* a un agente lisomotrófico (por ejemplo L-leucina-O-metil éster, éster del ácido dimetil L-glutámico o L-leucil-L-leucina-O-metil éster) (Patente de Estados Unidos N° 5.567.610, Borrebaeck *et al.*); y/o se pueden tratar *in vitro* linfocitos de sangre periférica humana empobrecidos en células T con adyuvantes tales como 8-mercaptoguanosina y citocinas (Patente de Estados Unidos N° 5.229.275, Goroff *et al.*).

Los linfocitos B recuperados del sujeto o inmunizados *in vitro*, generalmente se inmortalizan para generar un anticuerpo inmuoclonal humano. Las técnicas para inmortalizar el linfocito B incluyen, pero sin limitación: (a) fusión del linfocito B humano con células de mieloma murino o de heteromieloma humano-murino; (b) transformación viral (por ejemplo, con un virus de Epstein-Barr; véase Nugent *et al.*, citado anteriormente, por ejemplo); (c) fusión con una línea celular linfoblastoide; o (d) fusión con células de linfoma.

Los linfocitos pueden fusionarse con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Las células hibridoma preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino adecuadas (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero, mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos humanos también pueden generarse usando un hospedador no humano, tal como un ratón, que es capaz de producir anticuerpos humanos. Tal como se indicó anteriormente, actualmente se dispone de ratones

transgénicos que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito, que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal, da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); Patente de Estados Unidos N° 5.591.669; Patente de Estados Unidos N° 5.589.369; y Patente de Estados Unidos N° 5.545.807. También pueden prepararse anticuerpos humanos usando ratones SCID-hu (Duchosal *et al.* Nature 355: 258-262 (1992)).

En otra realización, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos humanos. La preparación de bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de los mismos es muy conocida en la técnica y para construir una familia de vectores de transformación que se puede introducir en las células hospedadoras puede usarse cualquiera de los métodos conocidos. Pueden prepararse bibliotecas de anticuerpos de cadena ligera y cadena pesada en fagos (Huse *et al.*, Science, 246: 1275 (1989)) o proteínas de fusión en fagos o fagémidos de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996); Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 7978-7982 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992); Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 89: 4457-4461 (1992); Griffiths *et al.*, EMBO Journal, 13: 3245-3260 (1994); de Kruijff *et al.*, J. Mol. Biol., 248: 97-105 (1995); documentos WO 98/05344; WO 98/15833; WO 97/47314; WO 97/44491; WO 97/35196; WO 95/34648; Patente de Estados Unidos N° 5.712.089; Patente de Estados Unidos N° 5.702.892; Patente de Estados Unidos N° 5.427.908; Patente de Estados Unidos N° 5.403.484; Patente de Estados Unidos N° 5.432.018; Patente de Estados Unidos N° 5.270.170; documentos WO 92/06176; WO 99/06587; Patente de Estados Unidos N° 5.514.548; documento WO97/08320; y Patente de Estados Unidos N° 5.702.892. El antígeno de interés se detecta frente a la fagoteca usando procedimientos conocidos en el campo para seleccionar anticuerpos de fagos que se unen al antígeno diana.

(iv) Anticuerpos humanizados

En la técnica se han descrito métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse para fabricar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. Después, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como la región marco conservada humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región marco conservada puede usarse para distintos anticuerpos humanizados (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

Además es importante que los anticuerpos se humanicen conservando la alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son conocidos para los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y muestran las estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite realizar un análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir del receptor y las secuencias importadas de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como un aumento de la afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están

directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión a antígeno.

(v) *Fragmentos de anticuerpos*

5 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, ahora estos fragmentos pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las fagotecas de anticuerpos anteriormente explicadas.
 10 Como alternativa, fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y *acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂* (Carter *et al.*, BiolTechnology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente de un cultivo de células hospedadoras. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán obvias para un profesional con experiencia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185 y las Patentes de Estados Unidos Nos 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) *Secuencias variantes de anticuerpos*

20 Se contempla la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo,
 25 deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación. Dichas alteraciones pueden realizarse al anticuerpo parental y/o anticuerpo multivalente y/o pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo multivalente en el momento de realizar esa secuencia.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis mediante alanina", como describen Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). En este caso, un resto o grupo de restos diana se identifica (por ejemplo restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Después, esas localizaciones de aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional para las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación de por sí no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, se realiza mutagénesis con alanina o aleatoria en la región o codón diana y los anticuerpos multivalentes expresados se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contiene cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos sencillos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto N terminal metionilo o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo para una TPEDA) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

50 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de las FR. En la Tabla 1 se muestran sustituciones conservativas debajo del encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, después pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o los productos pueden explorarse como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos.

Tabla 1

| Resto Original | Sustituciones a modo de ejemplo | Sustituciones Preferidas |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Ala (A) | val; leu; ile | val |
| Arg (R) | lys; gln; asn | lys |
| Asn (N) | gln; his; asp; lys; arg | gln |
| Asp (D) | glu; asn | glu |
| Cys (C) | ser; ala | ser |
| Gln (Q) | asn; glu | asn |
| Glu (E) | asp; gln | asp |
| Gly (G) | ala | ala |
| His (H) | asn; gln; lys; arg | arg |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; norleucina | leu |
| Leu (L) | norleucina; ile; val; met; ala; phe | ile |
| Lys (K) | arg; gln; asn | arg |
| Met (M) | leu; phe; ile | leu |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr | tyr |
| Pro (P) | ala | ala |
| Ser (S) | thr | thr |
| Thr (T) | ser | ser |
| Trp (W) | tyr; phe | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser | phe |
| Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; norleucina | leu |

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o en hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutros hidrófilos: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para aumentar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir el entrecruzamiento aberrante. Al contrario, puede añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad.

Un tipo particularmente preferido de variantes sustitucionales implica sustituir uno o más restos de regiones hipervariables de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante (o variantes) resultante seleccionada para el desarrollo posterior tendrá propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental a partir del que se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes sustitucionales implica la maduración por afinidad usando presentación de fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Los anticuerpos multivalentes generados de este modo se presentan de un modo monovalente a partir

de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III del M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes de exposición de fagos se exploran después para determinar su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) tal como se divulga en el presente documento. Para identificar sitios candidatos de regiones hipervariables para la modificación, se puede realizar la mutagénesis con la alanina para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos próximos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración, como se describe en el presente documento, y los anticuerpos con propiedades exclusivas en uno o más ensayos relevantes, pueden seleccionarse para desarrollo posterior.

Otro tipo de variantes de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende deleciónar uno o más restos de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la conexión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para la conexión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. Glucosilación ligada a O se refiere a la conexión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa con un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse la 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación en el anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para los sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse por la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan por varios métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Podría ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, de modo que se potencie la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (CCDA) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede realizarse introduciendo una o más modificaciones en los aminoácidos en una región Fc del anticuerpo, por lo tanto generando una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En una realización, la variante de la región Fc puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) en presencia de células efectoras humanas de manera más efectiva, o unirse a un receptor Fc gamma (Fc γ R) con mejor afinidad, que una región Fc de secuencia nativa. Dichas variantes de región Fc pueden comprender un modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

La variante de la región Fc con unión reducida a un Fc γ R puede comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Por ejemplo, la variante de la región Fc puede presentar unión reducida a un Fc γ RI y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 327 o 329 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

La variante de la región Fc puede presentar unión reducida a un Fc γ RII y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

La variante de la región Fc de interés puede presentar unión reducida a un FcγRIII y comprender una modificación de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

5 En otra realización, la variante de la región Fc presenta unión mejorada con el FcγR y comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

10 Por ejemplo, la variante de la región Fc puede presentar un aumento de la unión con un FcγRIII y opcionalmente, puede presentar además unión disminuida con un FcγRII. Un ejemplo de dicha variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos en la posición (posiciones) 298 y/o 333 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

15 La variante de la región Fc puede presentar un aumento de la unión con un FcγRII y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 337, 340, 378, 398 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Dichas variantes de región Fc con aumento de la unión a un FcγRII pueden mostrar además opcionalmente unión disminuida a un FcγRIII y pueden comprender, por ejemplo, una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 268, 272, 298, 301, 322 o 340 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

25 De manera alternativa o adicionalmente, la variante de la región Fc puede tener alterada la afinidad de unión del receptor Fc neonatal (FcRn). Dichas regiones de la variante de Fc pueden comprender una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 o 447 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Las variantes de la región Fc con unión reducida a un FcRn pueden comprender una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 o 447 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Las variantes de la región Fc anteriormente mencionadas pueden, como alternativa, presentar un aumento de la unión a FcRn y comprender una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 de la región Fc, donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

40 Las variantes de la región Fc con unión a C1q alterada (es decir mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) se describen en el documento WO99/51642. Dichas variantes pueden comprender una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 o 334 de la región Fc. Véase, también, Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); la Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; la Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y el documento WO94/29351 en lo que concierne a variantes de la región Fc.

45 Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, en el anticuerpo pueden incorporarse uno o más epítopos de unión a receptores de rescate (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptores de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable del aumento de la semivida en suero de la molécula de IgG.

(vii) Inmunoconjugados

55 La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

60 Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, una maitansina (Patente de Estados Unidos N° 5.208.020), un tricoteno y CC1065 también se contemplan en el presente documento.

65 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo está conjugado a una o más moléculas de maitansina (por

ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, por ejemplo, convertirse en Mai-SS-Me que se puede reducir a Mai-SH3 y reaccionar con el anticuerpo modificado (Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoconjugado anticuerpo-maitansinoide.

5 Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al.* Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al.* Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Véanse, también, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

15 Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

20 La presente invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como un desoxirribonucleasa; DNasa).

25 Se dispone de varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu.

30 Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos bis-activos de flúor, (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.* Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador inestable a ácidos, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992)).

40 Como alternativa, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico se puede hacer, por ejemplo por técnicas recombinantes o síntesis peptídica.

45 En aún otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para el uso en el predireccionamiento del tumor donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, después de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y después de la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

50 (viii) Terapia con profármacos mediada por enzimas dependiente de anticuerpos (TPEDA)

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en TPEDA, conjugando el anticuerpo con una enzima que activa el profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterapéutico peptídico, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos N° 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para la TPEDA incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal modo que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

60 Las enzimas que son útiles en el método de la invención incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como la proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tales como beta-galactosidasa y

- neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con beta-lactamas en fármacos libres; y amidasas de penicilina, tales como amidasa de penicilina V, o amidasa de penicilina G, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" para convertir los profármacos de la invención en fármacos libres activos (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse tal como se describe en el presente documento para suministrar la abzima a una población de células tumorales.
- 10 Las enzimas de esta invención pueden unirse covalentemente con los anticuerpos por técnicas bien conocidas en la materia, tales como el uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales, explicados anteriormente. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature, 312: 604-608 (1984)).

(ix) Otras modificaciones de anticuerpos

- 20 En el presente documento se contemplan otras modificaciones de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a una de varios polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

- 30 Los anticuerpos que se divulgan en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 4030 (1980); Patente de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

- 35 Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas, como se describe en Martin *et al.* J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está incluido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81 (19)1484 (1989).

D. Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

- 45 La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo, como se divulga en el presente documento, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

- 50 Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico codificante se aísla y se inserta en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican el anticuerpo). Existen numerosos vectores disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes elementos: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

- 60 El anticuerpo multivalente de esta invención puede producirse de manera recombinante, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que preferentemente es una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. Preferentemente la señal heteróloga seleccionada es una que reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas que no reconocen ni procesan la secuencia señal del anticuerpo multivalente nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras la secuencia señal nativa puede sustituirse, por

ejemplo, por la líder de la invertasa de levaduras, la líder del factor α (incluyendo líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o la líder de la fosfatasa ácida, la líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, se dispone de secuencias señal de mamíferos así como de líderes virales secretores, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

5 El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura al ADN que codifica el anticuerpo multivalente.

(ii) *Componente de origen de replicación*

10 Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico de la célula hospedadora, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican de manera autónoma. Dichas secuencias son muy conocidas para varias bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (normalmente, el origen de SV40 puede usarse solamente porque contiene el promotor temprano).

20 (iii) *Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos y a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suplementan nutrientes críticos no disponibles a partir del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacillus*.

25 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Estas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

30 Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo multivalente, tales como CHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

35 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identificaron por primera vez cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contenía metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) con déficit de actividad DHFR.

40 Como alternativa, pueden seleccionarse las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo multivalente, la proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

45 Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo N° de ATCC 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un ambiente efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar las cepas de levaduras con déficit *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos que se sabe que llevan el gen *Leu2*.

50 Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6 μ m para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Como alternativa, se notificó un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión multicopia estables para la secreción de seroalbúmina humana recombinante por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

(iv) *Componente promotor*

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que reconoce el organismo hospedador y que está ligado operativamente al ácido nucleico de anticuerpo multivalente. Los promotores adecuados para su uso en hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, otros promotores bacterianos conocidos son adecuados. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el anticuerpo multivalente.

Se conocen secuencias procariotas para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de numerosos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con levaduras hospedadoras incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levaduras también se usan ventajosamente con promotores de levaduras.

La transcripción de anticuerpos multivalentes a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y más preferentemente el Virus del Simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen de replicación viral del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el papilomavirus bovino es un vector como se divulga en la Patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc del β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, como promotor puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(v) *Componente de elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo multivalente de esta invención por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen numerosas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polio en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede someterse a corte y empalme dentro del vector a una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo multivalente, pero preferentemente se localiza en el sitio 5' del promotor.

(vi) *Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanas, o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de los ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados

de la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo multivalente. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se divulga en el mismo.

5 (vii) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento son las células procariotas, de levaduras, o de eucariotas superiores descritas anteriormente. Las procariotas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, 10 *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilos* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 15 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes.

Además de los procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifiquen anticuerpos multivalentes. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de panadero, es el más comúnmente utilizado dentro de los microorganismos 20 eucariotas inferiores hospedadores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de 25 *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo multivalente glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y células de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Diversas cepas virales para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1, del VPN de *Autographa californica* 30 y cepa Bm-5 del VPN de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden utilizar como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, semilla de soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como hospedadores. 40

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovarios de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 4216 (1980)); células sertoli murinas (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo 50 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario murino (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2); y células de mieloma o linfoma (por ejemplo células Y0, J558L, P3 y NS0) (véase Patente de Estados Unidos N° 5.807.715).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos multivalentes y se cultivan en medios convencionales nutrientes modificados tal como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. 55

60 (viii) Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras que se usan para producir el anticuerpo multivalente de esta invención pueden cultivarse en diversos medios. Medios comercialmente disponibles tales como el medio de Ham F10 (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem.102: 255 (1980), las Patentes de Estados Unidos N° 65

4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Registro de Patente de Estados Unidos 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario puede incluirse también a concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto habitual.

(ix) Purificación

15 Cuando se usan las técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo multivalente intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo multivalente se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos particulados, bien de las células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultracentrifugación. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a lo largo de aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo multivalente se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasas tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y los antibióticos se pueden incluir para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición del anticuerpo multivalente preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquiera de las regiones Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo multivalente. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos murinos y para la $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es más a menudo la agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como las de vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo mayores y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden alcanzar con la agarosa. Cuando el anticuerpo multivalente comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NY) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo multivalente para recuperar.

45 **E. Formulaciones farmacéuticas**

Las formulaciones farmacéuticas del anticuerpo multivalente se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo farmacéutico que tiene el grado deseado de pureza con vehículos fisiológicamente aceptables, excipientes o estabilizantes opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento puede contener además más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación para tratar, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Los ejemplos o combinaciones de compuestos activos se proporcionan en la Sección G a continuación titulada "Usos *In Vivo* del Anticuerpo Multivalente". Dichas moléculas están presentes adecuadamente

en combinación en cantidades que son eficaces para el fin deseado.

Los principios activos pueden estar también atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de distribución de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

10 Las formulaciones para usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo multivalente, cuyas matrices están en la forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsula. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o alcohol poli(vinílico)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de acetato de etilen-vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como el acetato de etilen vinilo y de ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces disulfuro intermoleculares a través del intercambio de tiodisulfuro, la estabilización se puede alcanzar modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

F. Usos no terapéuticos del anticuerpo multivalente

El anticuerpo multivalente de la invención puede usarse como un agente de purificación de afinidad. En este proceso, el anticuerpo multivalente se inmoviliza en una fase sólida tal como una resina Sephadex o un papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo multivalente inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno para purificar, y después de este periodo se lava el soporte con un disolvente adecuado para eliminar sustancialmente todo el material de la muestra excepto el antígeno para purificar, que se une al anticuerpo multivalente inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como un tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno del anticuerpo multivalente.

El anticuerpo multivalente también puede ser útil en ensayos diagnósticos, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero.

45 Para aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo multivalente normalmente se marcará con un resto detectable. Existen numerosos marcajes disponibles que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo multivalente puede marcarse con el radioisótopo usando técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) por ejemplo y radiactividad pueden medirse usando un contador de centelleo.

(b) Marcajes fluorescentes tales como los quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lisamina, ficoeritrina y Texas Red están disponibles. Los marcajes fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo multivalente usando las técnicas divulgadas en *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar usando un fluorímetro.

(c) Diversos marcajes de enzima-sustrato están disponibles y la Patente de Estados Unidos Nº 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromógeno que se puede medir usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por medio de una reacción química y después puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcajes enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos Nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacina, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano

5 picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisocima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Se describen técnicas para conjugar enzimas con los anticuerpos en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73: 147-166 (1981).

Los ejemplos de las combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

- 10 (i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de tinción (por ejemplo, diamina ortofenileno (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB));
- (ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-Nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y
- 15 (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Otras combinaciones numerosas de enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general de estas, véase las Patentes de Estados Unidos N° 4.275.149 y 4.318.980.

20 Algunas veces, el marcaje se conjuga indirectamente con el anticuerpo multivalente. El experto en la técnica estará al tanto de diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente puede conjugarse con biotina y cualquiera de las categorías amplias de marcajes anteriormente mencionados se puede conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y por lo tanto, el marcaje se puede conjugar con el anticuerpo multivalente de esta manera indirecta. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta del

25 marcaje con el anticuerpo multivalente, el anticuerpo multivalente se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de distintos tipos de los marcajes anteriormente mencionados se conjuga con un anticuerpo multivalente anti hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti digoxina). Por lo tanto, se puede conseguir la conjugación indirecta del marcaje con el anticuerpo multivalente.

30 En otra realización de la invención, el anticuerpo multivalente no necesita marcarse, y la presencia del mismo puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo multivalente.

El anticuerpo multivalente de la presente invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como los ensayos de unión competitiva, ensayos directos e indirectos tipo sándwich, y ensayos de

35 inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, páginas 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

El anticuerpo multivalente también puede usarse para ensayos diagnósticos *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo multivalente está marcado con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{13}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el antígeno o las células que lo expresan se pueden localizar usando inmunoescintigrafía.

40

G. Usos *In Vivo* del Anticuerpo Multivalente

45 Se contempla que el anticuerpo multivalente divulgado en el presente documento se puede usar para tratar un mamífero por ejemplo un paciente que padece, o está predispuesto a, una enfermedad o trastornos que podría beneficiarse de la administración del anticuerpo multivalente.

50 Cuando el anticuerpo multivalente se une a un receptor ErbB, tal como HER2, las afecciones para tratar con el mismo incluyen tumores benignos o malignos; leucemias y malignidades linfoides; otros trastornos tales como trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos, granulares, macrofágicos, epiteliales, estromales, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Generalmente, la enfermedad o trastorno para tratar con el anticuerpo que se une a un receptor ErbB es cáncer.

55 Los ejemplos de cáncer para tratar en el presente documento incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar incluyendo cáncer microcítico pulmonar, cáncer no macrocítico pulmonar, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma escamoso pulmonar, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer del páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon,

60 cáncer colorrectal, cáncer endometrial o uterino, cáncer de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, así como cáncer de cabeza y cuello.

65 El cáncer generalmente comprenderá células que expresan un antígeno que se une al anticuerpo, de modo que el anticuerpo es capaz de unirse al cáncer. En una realización, el cáncer puede caracterizarse por la sobreexpresión del antígeno (por ejemplo la sobreexpresión de un receptor ErbB). Para determinar la expresión del antígeno por el

cáncer están disponibles diversos ensayos diagnósticos/pronósticos. En una realización, la sobreexpresión del antígeno pueden analizarse por IHC, por ejemplo usando el HERCEPTEST® (Dako) cuando el antígeno es HER2. En el ensayo de IHC de HER2, secciones tisulares incluidas en parafina de una biopsia tumoral se pueden someter al ensayo IHC y se les pueden otorgar criterios de intensidad de la tinción de la proteína HER2 del siguiente modo:

- 5
- Puntuación 0 no se observa tinción o se observa tinción de membrana en menos del 10 % de las células tumorales.
- Puntuación 1+ se detecta una tinción débil o apenas detectable en más del 10 % de las células tumorales. Las células únicamente se tiñen en parte de su membrana.
- 10 Puntuación 2+ se observa una tinción de débil a moderada de la membrana completa en más del 10 % de las células tumorales.
- Puntuación 3+ se observa una tinción de moderada a fuerte de la membrana completa en más del 10 % de las células tumorales.

- 15 Se puede caracterizar que estos tumores con puntuaciones 0 o 1+ para la evaluación de la sobreexpresión de HER2 no sobreexpresan HER2, mientras que puede caracterizarse que los tumores con puntuaciones 2+ o 3+ sobreexpresan HER2.

- 20 Como alternativa, o adicionalmente, los ensayos FISH tales como el INFORM™ (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) pueden llevarse a cabo en tejido tumoral fijado con formalina, incluido en parafina para determinar el grado (si hay alguno) de la sobreexpresión del antígeno por el tumor.

- 25 En una realización, el cáncer será uno que expresa (y puede sobreexpresar) un receptor ErbB seleccionado del grupo que consiste en EGFR, ErbB3 y ErbB4. Los ejemplos de cánceres que pueden expresar/sobreexpresar EGFR, ErbB3 o ErbB4 incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón macrocítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, así como cáncer de cabeza y cuello así como glioblastomas.
- 30

- 35 El cáncer para tratar en el presente documento puede ser uno caracterizado por la activación excesiva de un receptor ErbB, por ejemplo EFGR. Dicha activación excesiva puede ser atribuible a la sobreexpresión o al aumento de la producción del receptor ErbB o un ligando ErbB. En una realización de la invención, se realizará un ensayo diagnóstico o pronóstico para determinar si el paciente de cáncer está caracterizado por una activación excesiva de un receptor ErbB. Por ejemplo, se puede determinar la amplificación y/o sobreexpresión de un gen ErbB de un receptor ErbB en el cáncer. Diversos ensayos para determinar dicha amplificación/sobreexpresión están disponibles en la técnica e incluyen los ensayos IHC, FISH y de antígenos liberados descritos anteriormente. Como alternativa, o
- 40 adicionalmente, los niveles de un ligando de ErbB, tal como TGF alfa, en o asociado con el tumor pueden determinarse de acuerdo con procedimientos conocidos. Dichos ensayos pueden detectar una proteína y/o ácido nucleico que la codifica en la muestra para ensayar. En una realización, los niveles de los ligandos de ErbB en el tumor se pueden determinar usando inmunohistoquímica (IHC), véase por ejemplo Scher *et al.* Clin. Cancer Research 1: 545-550 (1995). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden evaluar los niveles del ácido nucleico que codifica el ligando de ErbB en la muestra para ensayar; por ejemplo, por medio de hibridación fluorescente *in situ* o FISH, transferencia de southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 45

- 50 Además, la sobreexpresión o amplificación del receptor ErbB o ligando de ErbB se puede evaluar usando un ensayo diagnóstico *in vivo*, por ejemplo administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a la molécula para detectar y esté etiquetada con un marcaje detectable (por ejemplo un isótopo radiactivo) y explorando externamente al paciente para la localización del marcaje.

- 55 Cuando el anticuerpo se une a un antígeno de la superficie de una célula B, el anticuerpo puede usarse para tratar un linfoma de células B (incluyendo un linfoma de bajo grado/folicular no Hodgkin (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL de grado intermedio difuso; NHL de alto grado inmunoblástico; NHL de alto grado linfoblástico; NHL de alto grado de células no escindidas; enfermedad NHL voluminosa, linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; y leucemia melioblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posttrasplante (TLPT).
- 60

- 65 El anticuerpo, por ejemplo el anticuerpo anti antígeno de superficie de célula B, también se puede utilizar para tratar una enfermedad autoinmune. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero sin limitación, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias cutáneas incluyendo la psoriasis y la dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia sistémica y esclerosis; respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria intestinal (tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de dificultad respiratoria (incluyendo el síndrome de dificultad respiratoria del adulto; SDRA); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis;

glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma y otras afecciones que implican la infiltración de células T y las respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de la adhesión leucocitaria; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por ejemplo diabetes mellitus de Tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomiелitis alérgica, síndrome de Sjorgen; diabetes de aparición juvenil; y respuestas inmunes asociadas con la hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T normalmente encontradas en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis leucocitaria; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de daño multiorgánico; anemia hemolítica (incluyendo, pero sin limitación, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia gravis; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad antiglomerular de la membrana basal; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfingoide ampolloso; penfingoide; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome del hombre rígido; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis del complejo inmune; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmune (PTI) o trombocitopenia autoinmune, etc.

Los anticuerpos que se dirigen contra los antígenos de superficie de células B también pueden usarse para bloquear una respuesta inmune a un antígeno extraño. Por "antígeno extraño" en el presente documento se entiende una molécula o moléculas que es o que son no endógenas o nativas para el mamífero al que se exponen. El antígeno extraño puede provocar una respuesta inmune, por ejemplo una respuesta humoral y/o mediada por células T en el mamífero. Generalmente, el antígeno extraño provocará la producción de anticuerpos contra el mismo. Los ejemplos de antígenos extraños contemplados en el presente documento incluyen agentes inmunogénicos terapéuticos, por ejemplo proteínas tales como anticuerpos, particularmente anticuerpos que comprenden restos de aminoácidos no humanos (por ejemplo anticuerpos de roedores, quiméricos/humanizados y primatizados); toxinas (opcionalmente conjugadas con una molécula dirigida tal como un anticuerpo, en la que la molécula dirigida también puede ser inmunogénica); vectores virales de terapia génica, tales como retrovirus y adenovirus; injertos; agentes infecciosos (por ejemplo bacterias y virus); aloantígenos (es decir un antígeno que se da en algunos, pero no en otros miembros de la misma especie) tales como las diferencias en los tipos sanguíneos, antígenos linfocitarios humanos (ALH), antígenos plaquetarios, antígenos expresados en órganos trasplantados, componentes de la sangre, del embarazo (Rh), y factores hemofílicos (por ejemplo el Factor VIII y Factor IX).

El anticuerpo anti antígeno de superficie de célula B también puede usarse para desensibilizar un mamífero que está en la espera de un trasplante.

Los anticuerpos dirigidos contra un receptor de la superfamilia del receptor de TNF pueden emplearse para activar o estimular la apoptosis en células cancerosas.

En determinadas realizaciones, un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo conjugado con un agente citotóxico se administra al paciente. Preferentemente, el inmunoconjugado y/o antígeno al cual se unen son internalizados por la célula, dando como resultado un aumento de la eficacia terapéutica de los inmunoconjugados en la destrucción de la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferente, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con ácidos nucleicos en la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos observados en el presente documento (tales como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radiactivo, o una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN. Tal como se observa anteriormente, el anticuerpo multivalente también puede usarse para TPEDA.

La presente solicitud contempla combinar el anticuerpo multivalente (o inmunoconjugado del mismo) con uno o más agentes terapéuticos adicionales, especialmente para tratar el cáncer. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente puede coadministrarse con otro anticuerpo multivalente (o anticuerpos multivalentes), un anticuerpo (o anticuerpos) monovalente o bivalente, agente (agentes) quimioterapéutico (quimioterapéuticos) (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), otro u otros agente (agentes) citotóxico (citotóxicos), agente (agentes) antiangiogénico (antiangiogénicos), citocinas, y/o agente (agentes) inhibidor (inhibidores) del crecimiento. Cuando el anticuerpo multivalente induce la apoptosis, puede ser particularmente deseable combinar el anticuerpo multivalente con uno o más otro (otros) agente (agentes) terapéutico (terapéuticos) que también induzcan apoptosis. Por ejemplo, anticuerpos proapoptóticos (por ejemplo anticuerpos bivalentes o multivalentes) dirigidos contra antígenos en superficie de células B (por ejemplo los anticuerpos anti CD20 RITUXAN[®], ZEVALIN[®] o BEXXAR[®]) se pueden combinar con (1) anticuerpos proapoptóticos (por ejemplo anticuerpos bivalentes o multivalentes dirigidos contra un receptor de la superfamilia de receptores de TNF, tales como anticuerpos anti-DR4 o anticuerpos anti-DR5) o (2) con citocinas de la familia de citocinas de TNF (por ejemplo Apo2L). De forma similar, los anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo anticuerpo anti-HER2 HERCEPTIN[®]) se pueden combinar con (1) y/o (2). Como alternativa, o adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo haz de radiación externa o terapia con un agente marcado radiactivamente, tal como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas observadas anteriormente incluyen la administración combinada (donde los dos o más agentes se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso la administración de anticuerpo multivalente puede ocurrir antes de, y/o después de, la administración de la terapia o terapias adjuntas. El anticuerpo multivalente (y el agente terapéutico adjunto) se administra o administran por medios adecuados,

incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo multivalente se administra adecuadamente por infusión de pulsos, particularmente con dosis disminuidas del anticuerpo multivalente. Preferentemente la dosificación se da mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Aparte de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración del ácido nucleico que codifica el anticuerpo se abarca por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 que concierne al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Existen dos enfoques principales para conseguir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) dentro de las células del paciente, *in vivo* y *ex vivo*. Para el suministro *in vivo* el ácido nucleico se inyecta directamente al paciente, habitualmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente bien directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo las Patentes de Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Existe diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del hospedador deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico en las células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación por fosfato de calcio, etc. Un vector habitualmente usado para suministrar el gen *ex vivo* es un retrovirus. Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores virales (tales como un adenovirus, virus de Herpes simple I o virus adenoasociado) y sistemas lipídicos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente del ácido nucleico con un agente que se dirija a las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular de la célula diana, un ligando para un receptor de la célula diana, etc. Cuando se emplean los liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de la superficie de la membrana celular asociada con endocitosis pueden usarse para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo proteínas de la cápsida o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que se someten a internalización en ciclo, y proteínas que dirigen la localización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos actualmente conocidos para el marcaje génico y la terapia génica véase Anderson *et al.*, Science 256: 808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en el mismo.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo multivalente dependerá del tipo de enfermedad para tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo multivalente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo multivalente, y el criterio del médico que lo atiende. El anticuerpo multivalente se administra adecuadamente al paciente en un tiempo o a lo largo de una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo multivalente es una dosis inicial candidata para la administración al paciente, bien, por ejemplo, en una o más administraciones separadas, o en infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 µg/kg, o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

La composición del anticuerpo multivalente se formulará, dosificará y administrará de un modo coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el calendario de administración, y otros factores conocidos para los practicantes médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo multivalente para administrar estará gobernada por dichas consideraciones, y es la mínima cantidad necesaria para prevenir, mejorar, o tratar una enfermedad o trastorno. El anticuerpo multivalente opcionalmente se formula, aunque no es necesario, con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo multivalente presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con rutas de administración como se han usado anteriormente en el presente documento o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

H. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden estar formados de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo multivalente. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en la que la composición comprende un anticuerpo multivalente; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico adicional. El artículo de fabricación de esta realización de la invención puede comprender además un prospecto indicando que la primera y la segunda composición de anticuerpos pueden usarse para tratar cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Este puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

I. Depósito de materiales

Las siguientes líneas celulares de hibridoma se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

| Nombre del Anticuerpo | Nº ATCC | Fecha de Depósito |
|-----------------------|----------------|-----------------------|
| 7C2 (anti-HER2) | ATCC HB-12215 | 17 de octubre de 1996 |
| 7F3 (anti-HER2) | ATCC HB-12216 | 17 de octubre de 1996 |
| 4D5 (anti-HER2) | ATCC CRL 10463 | 24 de mayor de 1990 |
| 2C4 (anti-HER2) | ATCC HB-12697 | 8 de abril de 1999 |
| 3F11.39.7 (anti-OR5) | HB-12456 | 13 de enero de 1998 |
| 3H3.14.5 (anti-DR5) | HB-12534 | 2 de junio de 1998 |
| 3D5.1.10 (anti-DR5) | HB-12536 | 2 de junio de 1998 |
| 3H1.18.10 (anti-DR5) | HB-12535 | 2 de junio de 1998 |
| 4E7.24.3 (anti-DR4) | HB-12454 | 13 de enero de 1998 |
| 4H6.17.8 (anti-DR4) | HB-12455 | 13 de enero de 1998 |

La invención se entenderá de forma más completa por referencia a los siguientes ejemplos. Estos no deberían, sin embargo, considerarse como limitaciones del alcance de esta invención.

30 Ejemplo 1

Construcción de anticuerpos multivalentes

La construcción usada para generar un anticuerpo anti HER2 tetravalente, denominado un "anticuerpo Octopus" (OctHER2), se ilustra en la Figura 5 del presente documento. La estructura de este anticuerpo Octopus es la variante 8 del anticuerpo monoclonal humanizado recombinante 4D5 (rhuMAb 4D5-8) (Patente de Estados Unidos Nº 5.821.337, Carter *et al.*). La cadena pesada de rhuMAb 4D5-8 se subclonó en el vector pRK5 (documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989). La región VH-CH1 de la cadena pesada se eliminó por mutagénesis, y se insertaron tres sitios de restricción únicos (BamHI; NheI; BspEI). Estos sitios se incorporaron en cebadores de PCR diseñados para amplificar la región VH-CH1 de distintos anticuerpos. Los fragmentos resultantes se subclonaron en el vector para crear la cadena pesada del Octopus. La coexpresión de la cadena pesada del Octopus con la cadena ligera apropiada en un vector pRK5 en células de mamífero transfectadas dio como resultado el anticuerpo Octopus completo (Figura 4).

Las construcciones Octopus que contenían enlazadores flexibles insertados entre las regiones F en tándem también se manipularon genéticamente. A través de mutagénesis, el ADN que codificaba bien "gly-ser" (enlazador flexible 1) o "gly-ser-gly-ser" (SEQ ID NO: 10) (enlazador flexible 2) se insertó entre el ADN que codificaba las regiones VH-CH1 de la cadena pesada.

Ejemplo 2

Evaluación de los anticuerpos Octopus anti HER2

5 OctHER2 se expresó en células 293 transfectadas de forma transitoria (Graham *et al.* J. Gen. Virol. 36: 59-72 (1977)) y se purificó a lo largo de una columna de Proteína A sepharose. El anticuerpo completo es de aproximadamente 245 kDa, en comparación con el peso molecular de 150 kDa del anticuerpo parental. La cadena pesada de Octopus es de 75 kDa (sin carbohidrato), y la cadena ligera es de 30 kDa.

10 **Unión a antígeno**

La unión de OctHER2 al antígeno, dominio extracelular de HER2 (DEC HER2), se analizó usando un ensayo de ELISA para HER2 (Sias *et al.* J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Se recubrieron placas de 96 pocillos con el dominio extracelular (DEC) de HER2 (documento WO90/14357), y se incubaron con distintas diluciones de anticuerpos anti HER2. Después de lavar para eliminar el anticuerpo no unido, se añadió posteriormente un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa para detectar el anticuerpo anti HER2 unido al DEC. Después se añadió el sustrato apropiado, y los pocillos se visualizaron y después se cuantificaron en un lector de placas a 562 nm.

20 Los resultados del ELISA para el OctHER2, anticuerpo anti HER2 bivalente de IgG1 rhuMAb 4D5-8 expresado por las células 293, o anticuerpo anti HER2 bivalente HERCEPTIN® (comercialmente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, EE.UU.), se muestran en las Figuras 6A-C. OctHER2 se une al DEC de HER2 de una manera similar a HERCEPTIN® cuando se analizó en un ensayo de ELISA. El rhuMAb 4D5-8 expresado por las células 293 se une idénticamente al HERCEPTIN® vializado (producido por las células de Ovario de Hámster Chino (CHO)),
25 indicando que las células 293 no alteran sustancialmente la capacidad de unión a antígeno de los anticuerpos.

El análisis de ultracentrifugación se usó para determinar si el OctHER2 era capaz de unirse a la diana con los cuatro sitios de unión a antígeno. Distintas cantidades del dominio extracelular (DEC) de HER2 (documento WO90/14357) se titularon junto con el anticuerpo Octopus y, basándose en estas relaciones, se calculó el peso molecular medio de los complejos asumiendo que el anticuerpo Octopus bien tenía cuatro sitios de unión plenamente funcionales, o tres
30 sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos (círculos, asumiendo que OctHER2 tiene cuatro sitios de unión funcionales; y cuadrados, asumiendo que OctHER2 tiene tres sitios de unión funcionales) se compararon con los valores experimentales reales obtenidos (triángulos). Los valores experimentales representados en la Figura 7 se acercan más a la curva que representa los cuatro sitios de unión, sin embargo la tendencia observada es un
35 indicador de que los cuatro sitios no se unen probablemente con la misma afinidad.

Función biológica

40 *Ensayos antiproliferativos:* OctHER2 se comparó con HERCEPTIN® en ensayos funcionales que medían la inhibición del crecimiento de las líneas celulares tumorales que sobreexpresaban HER2. Se usó el ensayo de inhibición del crecimiento descrito en Lewis *et al.* Cancer Immuno. Immunother. 37: 255-263 (1993). Brevemente, se añadieron diluciones seriadas de OctHER2 y HERCEPTIN® al medio de las células sembradas a las que después se les permitió continuar creciendo durante cinco días. Después de este tiempo, se desechó el medio y las células se tiñeron con cristal violeta y se cuantificaron por espectrofotometría. El cristal violeta es una tinción colorimétrica que tiñe células, permitiendo por lo tanto la medición del crecimiento celular después del tratamiento.

En las células 3+ que sobreexpresaban HER2 (en las cuales HERCEPTIN® es muy eficaz), OctHER2 fue similar o ligeramente mejor en la inhibición del crecimiento de las células SKBR3 (Fig. 8A), sin embargo no fue tan eficaz en las células BT474 (Fig. 8B). De manera interesante, OctHER2 inhibió más eficazmente que HERCEPTIN® una línea
50 celular 2+ con sobreexpresión, MDA 361 (Fig. 8B).

Como se muestra en la Figura 9, las construcciones de enlazador flexible Octopus (OctHER2flex1, OctHER2flex2) inhibieron el crecimiento celular más eficazmente que HERCEPTIN®.

55 *Ensayos de Internalización:* A fin de evaluar la aplicación del anticuerpo Octopus en la terapia de inmunotoxina, se evaluaron sus capacidades de internalización. Para terapia con anticuerpo armado o de inmunotoxina, se conjugó un agente citotóxico con o se fusiona al anticuerpo y la inmunotoxina producida de este modo se une específicamente a su diana celular; la célula así unida internaliza el anticuerpo, y cataboliza o degrada el anticuerpo liberando la toxina que mata la célula.

60 En los ensayos de internalización realizados en el presente documento, el anticuerpo se radioyodó, e incubó durante tiempos variables con las células. A esto le siguieron medidas de la cantidad de anticuerpo intacto, no unido en el sobrenadante, la cantidad de anticuerpo unido a la superficie celular, la cantidad internalizada, y finalmente la cantidad catabolizada y degradada.

65 Los resultados de los ensayos de internalización realizados con respecto a una línea celular 3+ con sobreexpresión

(SKBR3) y una línea celular 2+ con sobreexpresión (MDA453) (las líneas sólidas representan sobreexpresores de HER2 2+ y las líneas discontinuas, sobreexpresores 3+) se representan en las Figuras 10A-B. Estos resultados indican que OctHER2, sorprendentemente, se internalizó y catabolizó dos veces más rápido que HERCEPTIN® en ambas líneas celulares. La internalización y catabolismo rápidos presentados por el anticuerpo Octopus es ideal para un anticuerpo armado. En comparación con el HERCEPTIN® no unido, hay muy poco anticuerpo Octopus libre en una célula 2+ con sobreexpresión. Una vez más, estos resultados sugieren que el anticuerpo Octopus podría ser un excelente candidato para conjugarse con agentes citotóxicos para la distribución en el tumor.

Autorradiografía de Microscopía Electrónica: Para confirmar que el anticuerpo Octopus se internalizaba y se degradaba en las vesículas apropiadas, y no solamente inespecíficamente, se usó autorradiografía de Microscopía Electrónica (ME). El anticuerpo Octopus se yodó e incubó con las células del mismo modo que en los ensayos de internalización. Los resultados representados en las Figuras 11A-C confirman que el anticuerpo Octopus se internalizaba en las vesículas correctas (endosoma temprano, Figura 11B, y lisosoma, Figura 11 C). Adicionalmente, el porcentaje de internalización observado con OctHER2 y HERCEPTIN® en estos ensayos coincidió con las medidas de los ensayos de internalización.

Ejemplo 3

Evaluación de Anticuerpos Octopus Anti-DR5

DR5 es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF que se une al Apo2L/TRAIL trimérico (Apo2L). Después de que los receptores Apo2L se unan a Apo2L y se agrupan, los dominios de muerte en la región citosólica de los receptores inducen caspasas para desencadenar la apoptosis celular. Se hicieron dos versiones de construcciones Octopus anti DR5: una a partir de 16E2, un anti DR5 clonado a partir de una fagoteca de Fv humanos monocatenarios (véase documento WO98/51793); el segundo anticuerpo Octopus anti DR5 se hizo a partir del Mab 3H3.14.5 (el anticuerpo "3H3"; ATCC HB-12534, documento WO99/64461), un mAb anti DR5 murino que induce la apoptosis cuando se entrecruza. Dado que los anticuerpos monoclonales anti receptores de Muerte pueden requerir entrecruzamiento para desencadenar la apoptosis, estos son candidatos para la construcción de anticuerpo Octopus. Los anticuerpos Octopus anti DR5 se prepararon reemplazando los dominios variables de la construcción OctHER2 descrita anteriormente por los dominios VL y VH de 16E2 o 3H3.

Los anticuerpos Octopus anti DR5 se analizaron en ensayos de apoptosis usando bien cristal violeta o tinción alamarBlue. Brevemente, se añadieron diluciones seriadas del anticuerpo Octopus o Apo2L al medio de las células sembradas a las que después se les permitió continuar creciendo durante 24 horas. Después de este tiempo, el medio fue bien desechado y las células se tiñeron con cristal violeta, o se añadió alamarBlue al medio y se incubó brevemente con las células. Las tinciones de cristal violeta tiñen las células, mientras el alamarBlue detecta la actividad metabólica en el medio de cultivo, por lo tanto estas tinciones permiten la medición de las células que sobreviven al tratamiento. La tinción por ambas tinciones colorimétricas, cristal violeta y alamarBlue, se cuantificó por espectrofotometría.

Como se muestra en las Figuras 12A-E, el Octopus 16E2, sorprendentemente, induce apoptosis con una potencia comparable a Apo2L en líneas celulares tumorales de pulmón (SK-MES-1; HOP 92) y colon (HCT116; COLO 205), sin embargo no causa apoptosis en la línea celular normal control (HUMEC). La apoptosis inducida por el Octopus 16E2 es caspasa dependiente.

El Octopus 16E2 anti DR5 también fue eficaz en la inducción de apoptosis *in vivo* y la reducción de un tumor de colon, humano, COLO205, en ratones desnudos atímicos. Como se muestra en la Figura 13A-D, las secciones histológicas de tejidos tumorales teñidas con hematoxilina y eosina de ratones tratados con el Octopus 16E2 o Apo2L indujeron niveles similares de células apoptóticas.

Los ratones tratados con el Octopus 16E2 también demostraron una disminución significativa del volumen tumoral, similar a la medida para el Apo2L y dos mAb bivalentes anti DR5, 16E2 y 3H3, como se muestra en la Figura 14. Los ratones que no recibieron ninguno de los anticuerpos anti DR5 o Apo2L (Vehículo) mostraron un aumento drástico del volumen tumoral debido al crecimiento incontrolado.

La actividad apoptótica del material usado en los estudios de ratón se confirmó en un ensayo de apoptosis *in vitro* en la Figura 15. El Octopus anti DR5 16E2 y el Apo2L usados en el estudio se compararon con un control positivo convencional para Apo2L y un control negativo con un MAb anti IgE (E25) en un ensayo de apoptosis alamarBlue.

La Figura 16 demuestra que el otro anticuerpo Octopus anti DR5, Octopus 3H3, es capaz de inducir apoptosis de manera similar que el Octopus 16E2. Adicionalmente, la Figura 16 muestra que la actividad apoptótica del anticuerpo Octopus no es dependiente del lote, ya que varios anticuerpos Octopus 16E2 preparados en distintas fechas mantienen la función similar.

En las Figuras 17A y B, la actividad apoptótica tanto del anticuerpo Octopus 16E2 como del 3H3 es mejor que la de la de Apo2L en una línea celular tumoral de pulmón, SK-MES-1 (Figura 17A), y una línea celular tumoral de células

T, Jurkat (Fig. 17B). Los anticuerpos Octopus anti DR5 pueden ser más eficaces agrupando DR5 en la superficie de la célula tumoral que Apo2L.

5 El Octopus 16E2 se analizó en una exploración de 2 días y 6 días contra el panel de líneas celulares tumorales humanas del Instituto Nacional de Cáncer (INC) en comparación con el Apo2L. Las Figuras 18A-C representan las curvas de dosis respuesta de 2 días que muestran los efectos del Octopus 16E2 y Apo2L en el crecimiento de varias líneas celulares de leucemia humana, cáncer de pulmón macrotítico, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central (SNC), melanoma, cáncer ovárico, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de mama, mientras que las Figuras 19A-C muestran las curvas de dosis respuesta de las exploraciones de 6 días. Se observaron resultados comparables para Octopus 16E2 y Apo2L contra la mayor parte de las líneas celulares tumorales, indicando de nuevo que las funciones del Octopus anti DR5 eran similares a Apo2L. Una inhibición similar de las líneas celulares de cáncer de pulmón y de colon confirmó los previos resultados *in vitro* e *in vivo* de los ensayos de apoptosis que comparaban el Octopus 16E2 y Apo2L en líneas celulares de estos cánceres. La capacidad de Octopus 16E2 para destruir determinadas líneas celulares tumorales fue inesperada; por ejemplo, una línea celular de cáncer del SNC, SF-295 (Fig. 19B), así como dos líneas celulares de cáncer renal, ACHN y RXF393 (Fig. 19C).

20 Los resultados de las exploraciones del panel tumoral del INC se representan cuantitativamente en las Figuras 20A y B (resultados de 2 días) y Figuras 21A y B (resultados de 6 días) que resumen el efecto del Octopus 16E2 en comparación con Apo2L en la inhibición del crecimiento (GI50), estasis (TGI), y la toxicidad (LC50) de las líneas celulares tumorales tratadas. De nuevo, estos resultados sugieren que el Octopus 16E2 puede ser eficaz contra más tipos de cáncer de los previamente observados.

Ejemplo 4

25 Evaluación del Anticuerpo Octopus anti-CD20

En un esfuerzo para mejorar la potencia del anticuerpo quimérico anti-CD20 CDB8 (RITUXAN®; Patente de Estados Unidos N° 5.736.137), un enfoque que se ha investigado es la capacidad del anticuerpo para desencadenar la apoptosis en células tumorales. Se realizó el ensayo de apoptosis en Koopman *et al.* Blood 84: 1415-1420 (1994). Un anticuerpo Octopus anti-CD20 (OctCD20) se preparó usando los dominios VL y VH del C2B8 en la preparación de un anticuerpo Octopus anti-CD20. El anticuerpo OctCD20 se expresó en células 293 y se purificó por medio de cromatografía de Proteína A sepharose como se ha descrito para los ejemplos anteriores.

35 Como se muestra en la Figura 22 el RITUXAN® solo no activa mucho la apoptosis en una línea celular de linfoma no Hodgkins, Wil-2, a menos que se entrecruce con una IgG antihumana (RITUXAN®-IgG). OctCD20, sin embargo, es capaz de inducir la apoptosis en células Wil-2 independientemente del entrecruzamiento. El nivel de apoptosis observado con OctCD20 es inferior que el de RITUXAN® entrecruzado, sin embargo, lo que sugiere que la actividad del OctCD20 podría mejorarse, quizás a través del uso de enlazadores flexibles.

40 Ejemplo 5

Construcción de anticuerpos multivalentes adicionales

45 Se obtuvieron por ingeniería genética versiones de los anticuerpos Octopus del Ejemplo 2 (anti-HER2), Ejemplo 3 (anti-DR5) y Ejemplo 4 (anti-CD20) con un dominio de dimerización de la región bisagra de un anticuerpo (designado "F(ab')₂ Octopus" en el presente documento). La construcción Octopus anti-HER2 F(ab')₂ se manipuló genéticamente reemplazando la región Fc del ADNc de cadena pesada con la secuencia que codifica un motivo de cremallera de leucina que, cuando se expresa como proteína, dimeriza para unir eficazmente los brazos del Octopus Fab (Fig. 23C). El octopus F(ab')₂ puede mantener el motivo de cremallera de leucina, o ese motivo puede, por ejemplo, eliminarse proteolíticamente según se desee. Como se representa en la Figura 24, se usó PCR para amplificar los dominios VH/CH1 duplicados y para insertar un sitio de restricción al final del ADNc de la cadena pesada del Octopus (NotI) para permitir la subclonación en fase dentro de un vector (VG15) que contiene un motivo de cremallera de leucina. Se utilizó la PCR otra vez para añadir otro sitio de restricción corriente abajo del codón de terminación de la cadena pesada (XhoI) para permitir la subclonación dentro del vector pRK para la expresión en células de mamífero. Los dominios VH/CH1 del Mab anti-DR5 16E2 y Mab anti-CD20 C2B8 se sustituyeron en el esqueleto de la cadena pesada Oct F(ab')₂ usando los sitios de restricción únicos BamHI, NheI, y BspEI.

60 Los anticuerpos "POPoctopus" se crearon uniendo conjuntamente los dominios Fab en repeticiones en tándem para formar multímeros Fab lineales. "POPoct-3" contiene tres dominios Fab unidos (Fig. 23D), mientras que "POPoct-4" tiene cuatro repeticiones de Fab (Fig. 23E). Se generaron construcciones anti-HER2 (rhuMab 4D5), anti-DR5 (16E2) y anti-CD20 (C2B8) POPoct-3, tal como las construcciones anti-HER2 (rhuMab 4D5) y anti-DR5 (16E2) POPoct-4. Los anticuerpos POPoct-3 se manipularon genéticamente tanto con como sin enlazadores flexibles 1.

65 La Figura 25 representa la construcción del ADNc de la cadena pesada del POPoct-3. La PCR se usó para amplificar el dominio VH/CH1 añadiendo un sitio 5'-BspEI y un sitio 3'-NotI. Esta secuencia se digirió y junto con la cadena pesada de Octopus digerida por BamHI/BspEI, se ligó en un vector pRK para producir una cadena pesada

de Octopus que contenía una secuencia para tres dominios VH/CH1. El sitio BspEI codifica un resto de serina y una glicina.

5 Para modificar genéticamente el anticuerpo POPoct-4 (Fig. 26), se usó oligomutagénesis de sitio dirigido para introducir una mutación silenciosa, dando como resultado la eliminación del sitio de restricción NheI entre los dominios duplicados VH/CH1 del ADNc de la cadena pesada del Octopus. Se empleó nuevamente la oligomutagénesis para añadir un sitio de restricción NheI inmediatamente corriente abajo de la segunda secuencia VH/CH1. Este ADNc junto con la construcción POPoct-3 se digirió con las endonucleasas de restricción BamHI/NheI, y se ligó junto con el vector pRK para producir un ADNc de la cadena pesada que contenía una
10 secuencia para cuatro dominios VH/CH1.

Las distintas cadenas pesadas de Octopus se cotransfectaron transitoriamente con los ADNc apropiados de la cadena ligera en células 293 de mamíferos para expresar anticuerpos que contenían bien tres dominios Fab (POPoct-3 Fab) o cuatro dominios Fab (Octopus de longitud completa; Octopus F(ab)₂; POPoct-4 Fab). Mientras
15 que los Mab IgG nativos y los anticuerpos Octopus de longitud completa se purificaron en Proteína A sepharose, Octopus F(ab)₂ y POPoct-3 y -4 se purificaron a lo largo de columnas de Proteína G sepharose.

El Octopus F(ab)₂ es de aproximadamente 200 kDa (Fig. 23F, carril 4), menor que los 240 kDa del anticuerpo Octopus de longitud completa (Fig. 23F, carril 3), pero mayor que el Mab de IgG nativo de 150 kDa (Fig. 23F, carriles 1 y 2). A aproximadamente 140 kDa (Fig. 23F, carril 5), POPoct-3 es ligeramente menor que el Mab de IgG nativo, mientras que POPoct-4 es ligeramente mayor a 190 kDa. La cadena pesada del Octopus F(ab)₂ (Fig. 23G, carril 4) es aproximadamente del mismo tamaño que la cadena pesada del Mab de IgG nativo (Fig. 23G, carriles 1 y 2) a 55 kDa. La cadena pesada del POPoct-3 (Fig. 23G, carril 5) es de un tamaño similar a la cadena pesada del Octopus de longitud completa (Fig. 23G, carril 3), mientras que a aproximadamente 97 kDa el POPoct-4 tiene la cadena
25 pesada más larga.

Ejemplo 6

Evaluación de los anticuerpos anti-HER2 multivalentes

30 *Ensayos antiproliferativos:* se añadieron OctHER F(ab)₂, POPoct-3 HER2, OctHER2, OctHER2 flex 1, y rhuMab 4D5 (HERCEPTIN®) a la línea celular tumoral 3+ con sobreexpresión de HER2, BT474, a concentraciones equimolares y se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento celular tal como se midió por la tinción con cristal violeta. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Fig. 27. A pesar de que todos los anticuerpos indujeron alguna
35 citostasia de las células BT474, POPoct-3HER2 y rhuMab 4D5 mostraron la mayor eficacia e inhibieron el crecimiento de forma equivalente, mientras que OctHER2 F(ab)₂ perdió potencia rápidamente a medida que su concentración disminuyó. OctHER2 flex1 demostró una mejora ligera pero uniforme sobre OctHER2 (n=6), sugiriendo que la flexibilidad mejorada puede dar como resultado un acceso mejor del Fab a la diana HER2.

40 También se evaluó OctHER2, OctHER2 flex-1, POPoct-3HER2, POPoct-3HER2 flex-1 y rhuMab 4D5 (HERCEPTIN®), a concentraciones equimolares en otra línea celular 3+ con sobreexpresión de HER2, SKBR3, en ensayo de citostasia de cristal violeta. Los resultados de este ensayo se representan en la Figura 28. En esta línea celular, todas las construcciones de Octopus ensayadas inhibieron el crecimiento celular de forma equivalente, y mejor que el rhuMab 4D5 (n=4). Cualquier mejora en la eficacia debida al enlazador flexible entre los brazos Fab de
45 OctHER2 o POPoct-3 fue menos evidente en esta línea celular.

Ensayos de internalización: se comparó POPoct-3HER2 con OctHER y HERCEPTIN® en ensayos de internalización en dos líneas celulares tumorales 3+ con sobreexpresión de HER2, SKBR3 y BT474, para evaluar su candidatura para aplicaciones en terapias de inmunotoxinas. Aunque era estructuralmente diferente al anticuerpo OctHER2 de
50 longitud completa, POPoct-3HER2 se internalizó y catabolizó de forma idéntica a OctHER2 en ambas líneas celulares (Figs. 29A y B) y al doble de la velocidad que HERCEPTIN®.

Ejemplo 7

Evaluación de anticuerpos anti-DR5 multivalentes

Ensayos de apoptosis: versiones multivalentes del Mab anti-DR5 16E2 se evaluaron en este ejemplo. Oct1DR5, OctDR5flex-1, OctDR5F(ab)₂, POPoct-3DR5, POPoct-3DR5flex-1 y POPoct-4 DR5 se añadieron a concentraciones equimolares a la línea celular tumoral de colon COLO205 y se analizaron en ensayos de apoptosis en cristal violeta
60 en comparación con el Mab 16E2 (n=4). Los resultados se muestran en las Figuras 30A y B. Todos los anticuerpos Octopus indujeron más apoptosis que el Mab 16E2, con el orden de eficacia del más al menos potente: OctDR5flex-1 > OctDR5 = POPoct-4 DR5 = POPoct-3flex-1 DR5 = POPoct-3DR5 > OctDR5F(ab)₂ > Mab 16E2. OctDR5flex-1 mostró un aumento de la potencia en comparación con OctDR5, especialmente a menores concentraciones (Fig. 30A), indicando que la flexibilidad entre los brazos Fab mejora la eficacia. POPoct-3flex-1DR5 indujo niveles equivalentes de apoptosis que OctHER (Fig. 30A) y mostró una eficacia similar a POPoct16-3 y POPoct16-4. (Fig. 30B).

Señalización celular: Apo2L se une a los receptores de muerte y desencadena la apoptosis celular a través de la ruta de señalización de las caspasas. Como se muestra en las Figuras 31A y B, se mostró que los anticuerpos Octopus anti-DR5 inducían apoptosis a través de la misma ruta de señalización que Apo2L. Oct16E2 desencadenó similares niveles de apoptosis que APO2L en la línea celular tumoral de pulmón SK-MES-1 (Fig. 31A, líneas discontinuas), pero después de la adición de ZVAD, un inhibidor de la caspasa 3 y 9, la apoptosis celular desencadenada tanto por Apo2L como por Oct16E2 se inhibió (Fig. 31B líneas continuas). Se obtuvieron pruebas adicionales de que los anticuerpos Octopus anti-DR5 señalizaban a través de la misma ruta que Apo2L por análisis DISC (Complejo de Señalización Inducido por Muerte) (Fig. 31B). Las células BJAB, una línea celular de linfoma de células B que expresa DR5, se incubaron a dos concentraciones diferentes de dos anticuerpos Octopus anti-DR5, Oct16E2 y Oct3H3, durante tiempos variables. La purificación de los complejos anticuerpo DR5 se siguió por análisis de transferencia de Western para identificar las moléculas de señalización que se purificaban conjuntamente con los complejos. Como con Apo2L, las moléculas de señalización caspasa 8 y FADD asociadas con DR5 después del receptor se unieron tanto por Oct16E2 como por Oct3H3 (Fig. 31B).

15 Ejemplo 8

Evaluación del anticuerpo Octopus anti-CD20

Ensayos de apoptosis: como se muestra en la Figura 22, RITUXAN® no desencadenó eficazmente la apoptosis *in vitro* en la línea celular de linfoma de células B en WIL-2 a menos que se entrecruzase primero con un anticuerpo anti IgG. OctCD20 fue capaz de inducir la apoptosis de las células WIL-2 independientemente del entrecruzamiento, a niveles mayores que el RITUXAN® solo, pero ligeramente inferiores que el RITUXAN® entrecruzado con anti IgG. Cuando se entrecruzó con anticuerpo anti IgG, OctCD20 indujo más apoptosis de las células WIL-2 que el RITUXAN® entrecruzado (Fig. 32). Dado que una explicación potencial para la eficacia de RITUXAN® *in vivo* es que el anticuerpo está entrecruzado por cualquier de las células que transportan FcγR, esta observación sugiere que OctCD20 será aún más eficaz *in vivo*.

OctCD20 F(ab)₂, POPoct-3CD20 y POPoct-3CD20flex-1 se ensayaron a diversas concentraciones en ensayos de apoptosis con células WIL-2, y las dosis óptimas se muestran en las curvas de máxima respuesta en la Figura 33. Los anticuerpos Octopus se compararon con el anticuerpo anti-CD20 1 F5 (Clark *et al.* citado anteriormente), cuyas funciones son similares a las de RITUXAN® en cuanto que este no induce la apoptosis a menos que esté entrecruzado con un anticuerpo anti IgG. Ambos anticuerpos Octopus ensayados indujeron niveles similares (OctCD20 F(ab)₂) o superiores (POPOct-3CD20, POPoct-3CD20flex-1) de apoptosis que el anti-CD20 IF5 entrecruzado. Adicionalmente, los anticuerpos Octopus fueron eficaces a concentraciones considerablemente menores que las del anti-CD20 entrecruzado.

Cuando los anticuerpos anti-CD20 entrecruzados se añaden a la línea de linfoma de células B WIL-2S, se observa una adhesión homotípica de las células. Esta agrupación celular es una indicación de que las células se han activado a través de CD20. Los anticuerpos Octopus anti-CD20 inducen el mismo fenómeno de adhesión homotípico independiente de entrecruzador, y como se muestra en la Figura 34 con POPoct-3CD20, a concentraciones mucho menores que el anti CD20 IF5.

La inducción de apoptosis por los diversos anticuerpos anti-CD20 se evaluó adicionalmente usando sangre de un paciente con leucemia linfocítica crónica (CLL). Los LSP se separaron usando sedimentación por dextrano, se lavaron y se sembraron en medio para linfocitos sin suero, se trataron durante toda la noche sin muestra, con 1 F5 (20 µg/ml), 1F5+entrecruzado de ratón anti IgG (100 µg/ml), OctCD20 F(ab)₂ a aproximadamente 0,5 o 1,0 µg/ml y POPoct-3 CD20 a 0,5 µg/ml.

Se realizó un ensayo de apoptosis usando tinción de anexina e IP. El porcentaje de células apoptóticas fue:

50

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Sin tratar | 38,5 % |
| 1F5 | 37,1 % |
| 1F5 X-unidas con anti-IgG | 25,1 % |
| POPoct-3 CD20 (0,5 µg) | 50,2 % |
| OctCD20 F(ab) ₂ (0,5 µg) | 37,7 % |
| OctCD20 F(ab) ₂ (1,0 µg) | 48,6 % |

Los datos indican que los anticuerpos anti-CD20 multivalentes (especialmente POPoct-3 CD20) potencian la apoptosis de una manera dependiente de la dosis.

55 *Ensayos de internalización:* OctCD20 también se evaluó como candidato para terapia con inmunotoxinas en ensayos

de internalización en tres líneas de linfoma de células B, DB, WIL-2 y Ramos, y se comparó con RITUXAN®. Tal como se muestra en la Figura 35 se internalizó el doble de OctCD20 por las células en comparación con RITUXAN®, que no se internalizó por las células a niveles apreciables. La mayor habilidad que se podría esperar para los anticuerpos multivalentes debido al aumento del número de sitios de unión es evidente en el hecho de que más OctCD20 permanece unido a la superficie celular de las células a lo largo del tiempo en comparación con RITUXAN®.

Listado de secuencias sustituto

10 <110> Genentech, Inc.
 <120> ANTICUERPOS MULTIVALENTES Y USOS DE LOS MISMOS
 <130> EAH/FP7064413
 15 <140> EP
 <141> 20-03-2001
 <150> EP 01920580.6
 20 <151> 20-03-2001
 <150> PCT/US01/08928
 <151> 20-03-2001
 25 <150> US 60/195,819
 <151> 11-04-2000
 <160> 13
 30 <170> Patent-In 3.5
 <210> 1
 <211> 218
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

ES 2 637 801 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

5 <210> 2
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 637 801 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

<210> 3
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 637 801 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

<210> 4
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

10

ES 2 637 801 T3

```

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
      35                                40                                45

Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
      50                                55                                60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
      65                                70                                75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      80                                85                                90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
      95                                100                               105

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
      110                               115                               120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
      125                               130                               135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
      140                               145                               150

Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr
      155                               160                               165

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
      170                               175                               180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
      185                               190                               195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
      200                               205                               210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      215

```

<210> 5
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

5

ES 2 637 801 T3

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 Glu Trp Glx Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 215

5 <210> 6
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 6

ES 2 637 801 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Pro | Glu | Val | Ser | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| Lys | Asp | Val | Leu | Thr | Ile | Thr | Leu | Thr | Pro | Lys | Val | Thr | Cys | Val |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 |
| Val | Val | Asp | Ile | Ser | Lys | Asp | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Ser | Trp |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 |
| Phe | Val | Asp | Asp | Val | Glu | Val | His | Thr | Ala | Gln | Thr | Gln | Pro | Arg |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 |
| Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Ser | Val | Ser | Glu | Leu | Pro |
| | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 |
| Ile | Met | His | Gln | Asp | Cys | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Phe | Lys | Cys | Arg |
| | | | | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 |
| Val | Asn | Ser | Ala | Ala | Phe | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |
| | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | 105 |
| Lys | Thr | Lys | Gly | Arg | Pro | Lys | Ala | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Ile | Pro |
| | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | 120 |
| Pro | Pro | Lys | Glu | Gln | Met | Ala | Lys | Asp | Lys | Val | Ser | Leu | Thr | Cys |
| | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 |
| Met | Ile | Thr | Asp | Phe | Phe | Pro | Glu | Asp | Ile | Thr | Val | Glu | Trp | Gln |
| | | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 |
| Trp | Asn | Gly | Gln | Pro | Ala | Glu | Asn | Tyr | Lys | Asn | Thr | Gln | Pro | Ile |
| | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | 165 |
| Met | Asp | Thr | Asp | Gly | Ser | Tyr | Phe | Val | Tyr | Ser | Lys | Leu | Asn | Val |
| | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | 180 |
| Gln | Lys | Ser | Asn | Trp | Glu | Ala | Gly | Asn | Thr | Phe | Thr | Cys | Ser | Val |
| | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | 195 |
| Leu | His | Glu | Gly | Leu | His | Asn | His | His | Thr | Glu | Lys | Ser | Leu | Ser |
| | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 |
| His | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | | | | | |
| | | | | 215 | | | | | | | | | | |

<210> 7
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

5

10

ES 2 637 801 T3

```

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1                               5                               10                               15

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
                               20                               25                               30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
                               35                               40                               45

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
                               50                               55                               60

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
                               65                               70                               75

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
                               80                               85                               90

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
                               95                               100                              105

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
                               110                              115                              120

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
                               125                              130                              135

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
                               140                              145                              150

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
                               155                              160                              165

Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
                               170                              175                              180

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
                               185                              190                              195

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
                               200                              205                              210
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
                               215

```

<210> 8
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 8

5

10

ES 2 637 801 T3

```

Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1                5                10                15

Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
                20                25                30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
                35                40                45

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
                50                55                60

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
                65                70                75

His Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
                80                85                90

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
                95                100                105

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
                110                115                120

Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser
                125                130                135

Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val
                140                145                150

Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
                155                160                165

Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys
                170                175                180

Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser
                185                190                195

Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
                200                205                210

Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
                215

```

<210> 9
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 9

```

10          Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
           1                5                10                15

```

ES 2 637 801 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Ala | Leu | Met | Ile | Ser | Leu | Thr | Pro | Lys | Val |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 |
| Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Glu | Asp | Asp | Pro | Asp | Val | His |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 |
| Val | Ser | Trp | Phe | Val | Asp | Asn | Lys | Glu | Val | His | Thr | Ala | Trp | Thr |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 |
| Gln | Pro | Arg | Glu | Ala | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser |
| | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 |
| Ala | Leu | Pro | Ile | Gln | His | Gln | Asp | Trp | Met | Arg | Gly | Lys | Glu | Phe |
| | | | | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 |
| Lys | Cys | Lys | Val | Asn | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Arg |
| | | | | 95 | | | | | 100 | | | | | 105 |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Pro | Lys | Gly | Arg | Ala | Gln | Thr | Pro | Gln | Val | Tyr |
| | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | 120 |
| Thr | Ile | Pro | Pro | Pro | Arg | Glu | Gln | Met | Ser | Lys | Lys | Lys | Val | Ser |
| | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 |
| Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Thr | Asn | Phe | Phe | Ser | Glu | Ala | Ile | Ser | Val |
| | | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 |
| Glu | Trp | Glu | Arg | Asn | Gly | Glu | Leu | Glu | Gln | Asp | Tyr | Lys | Asn | Thr |
| | | | | 155 | | | | | 160 | | | | | 165 |
| Pro | Pro | Ile | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Thr | Tyr | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys |
| | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | 180 |
| Leu | Thr | Val | Asp | Thr | Asp | Ser | Trp | Leu | Gln | Gly | Glu | Ile | Phe | Thr |
| | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | 195 |
| Cys | Ser | Val | Val | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | His | Thr | Gln | Lys |
| | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 |
| Asn | Leu | Ser | Arg | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | | |
| | | | | 215 | | | | | | | | | | |

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> La secuencia se sintetiza

10

<400> 10

Gly Ser Gly Ser
 1

15

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 637 801 T3

<220>

<223> La secuencia se sintetiza

<400> 11

5

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 12

<211> 4

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> SITE

15

<222> 1-4

<223> Aminoácidos en el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo

<400> 12

20

Glu Val Gln Leu
1

<210> 13

<211> 4

25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> SITE

30

<222> 1-4

<223> Aminoácidos en el dominio constante de cadena pesada (CH1) de anticuerpo

<400> 13

Lys Thr His Thr
1

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo aislado que comprende un primer y un segundo polipéptidos de cadena pesada, al menos dos polipéptidos de cadena ligera y cuatro sitios de unión a antígeno, en donde dichos primer y segundo polipéptidos de cadena pesada comprenden



10 en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada (VH), VD2 es un segundo dominio VH, Fc es una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido y n es 0 o 1, en donde cada uno de los al menos dos polipéptidos de cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera (VL), en donde cada uno de dichos cuatro sitios de unión a antígeno está formado por un dominio VH del primer o del segundo polipéptidos de cadena pesada y un dominio VL de los al menos dos polipéptidos de cadena ligera.

15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende dos polipéptidos de cadena ligera.

3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que los dos dominios variables de cadena pesada están fusionados entre sí.

20 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X2 del primer polipéptido de cadena pesada y el segundo polipéptido de cadena pesada comprenden un dominio CH1, en donde CH1 es un dominio constante de cadena pesada.

25 5. El anticuerpo de las reivindicaciones 3 o 4, en el que $\text{VD1-(X1)}_n\text{-VD2-(X2)}_n\text{-Fc}$ del primer polipéptido de cadena pesada y el segundo polipéptido de cadena pesada comprenden VH-VH-CH1-Fc.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en el que X1 comprende un enlazador flexible C-terminal de VD1.

30 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que $\text{VD1-(X1)}_n\text{-VD2-(X2)}_n\text{-Fc}$ del primer polipéptido de cadena pesada y el segundo polipéptido de cadena pesada comprenden VH-enlazador flexible-CH1-Fc.

35 8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los al menos dos polipéptidos de cadena ligera comprenden además un dominio constante de cadena ligera (dominio CL).

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos cuatro o más dominios VL y en donde cada dominio VL está fusionado opcionalmente con un dominio CL.

40 10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que los al menos dos polipéptidos de cadena ligera comprenden cada uno VL-VL-CL.

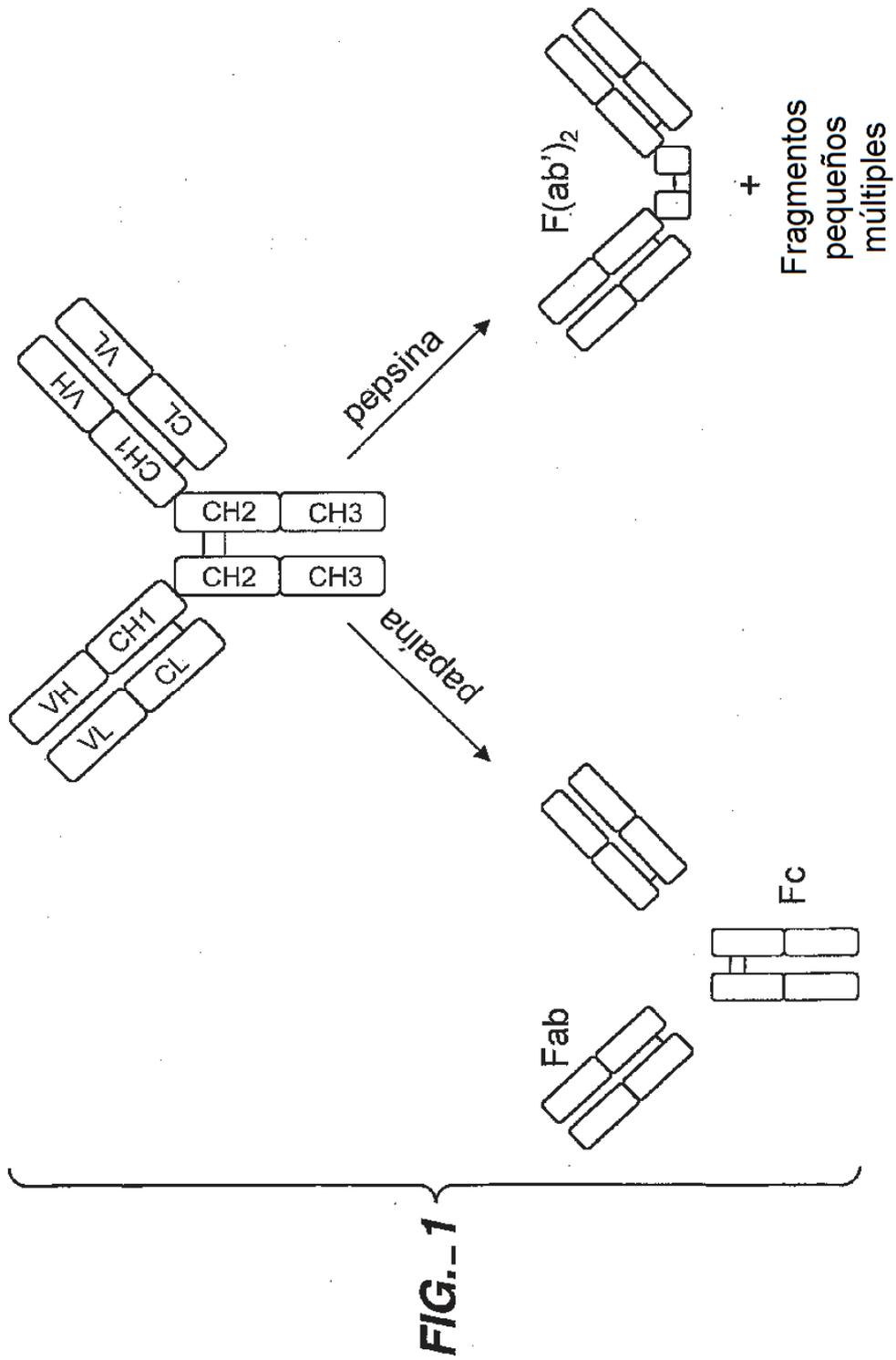
45 11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que el enlazador flexible comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en gly-ser, gly-ser-gly-ser (SEQ ID NO: 10), ala-ser y gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO: 11).

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo no comprende una secuencia nativa de un anticuerpo IgM o IgA.

50 13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es internalizado más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos.

14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los cuatro sitios de unión a antígeno se unen al mismo antígeno.

55 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que los cuatro sitios de unión a antígeno se unen a dos o más antígenos diferentes.



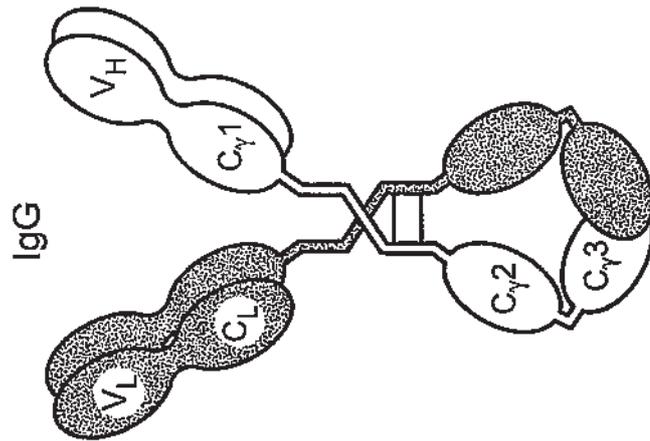
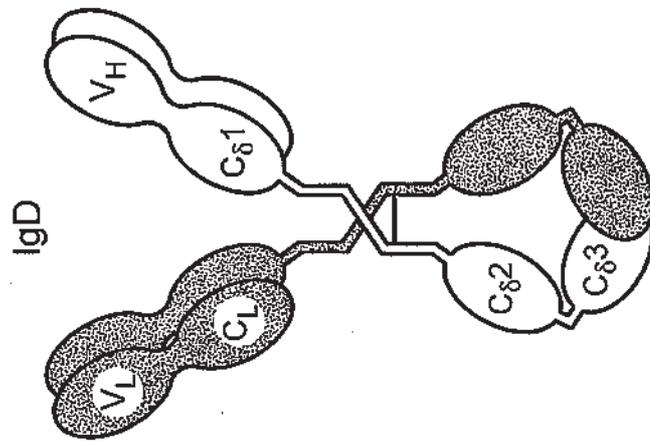
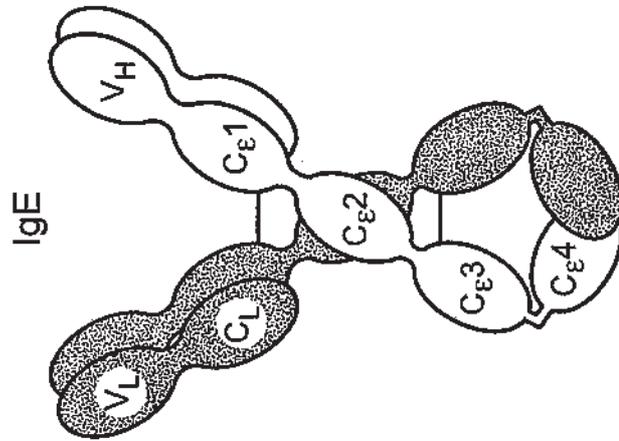


FIG._2C

FIG._2B

FIG._2A

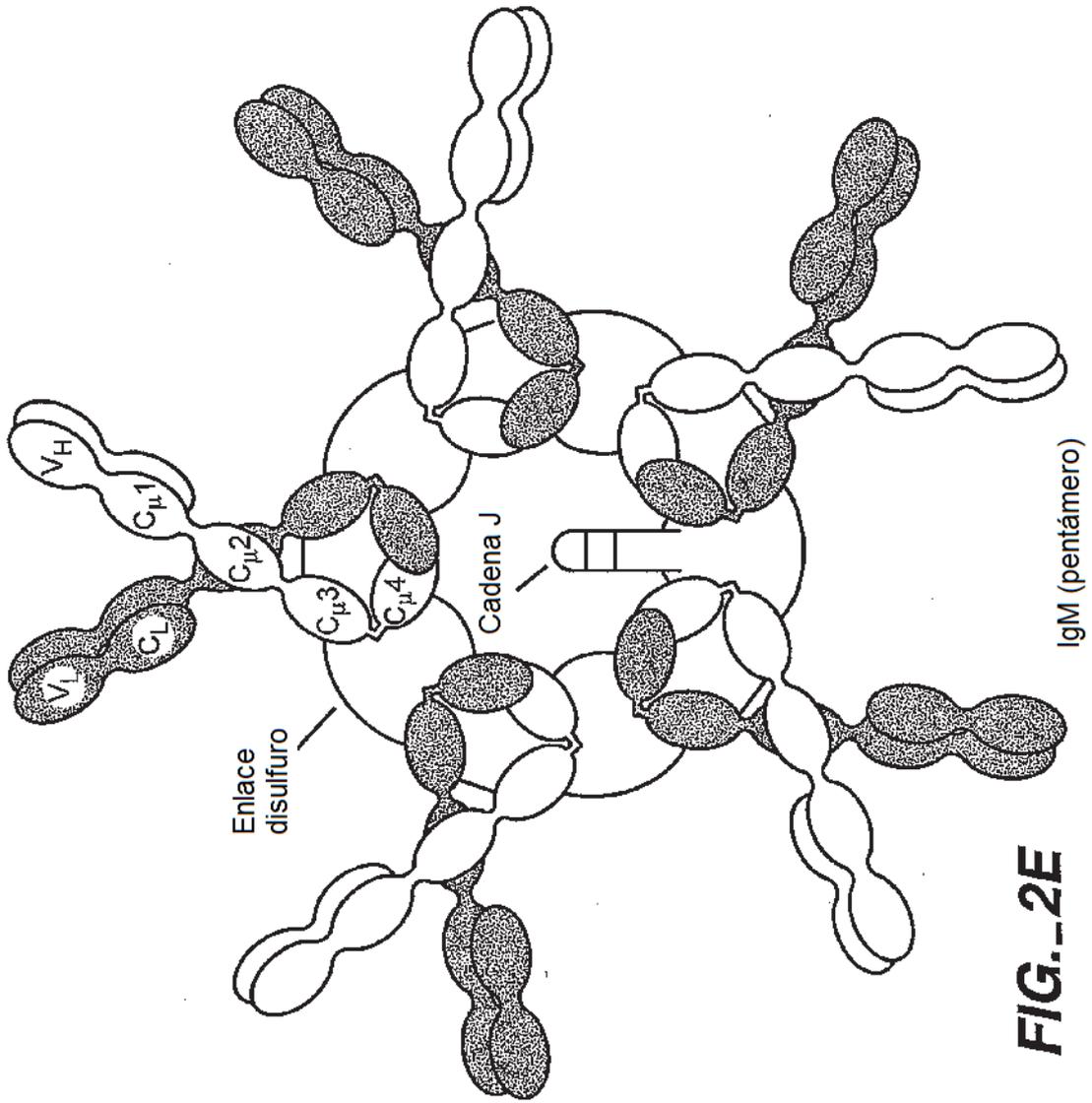


FIG.--2E

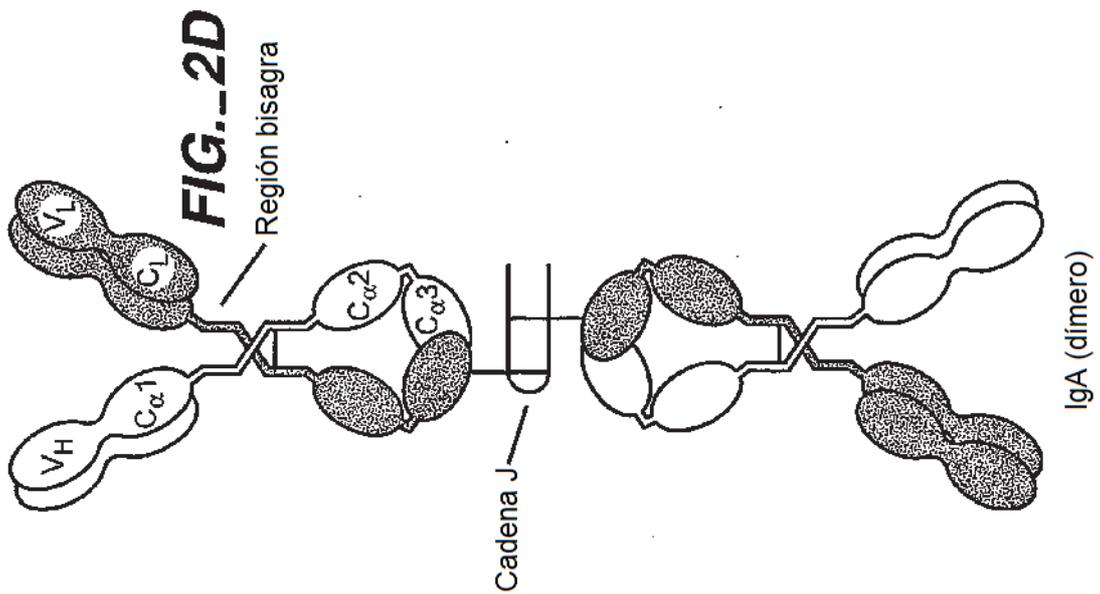


FIG.--2D

| | | | | | |
|----------|---|-----|-----|-----|-----|
| | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| IgG1 hum | PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV | | | | |
| IgG2 hum | PAP- PVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV | | | | |
| IgG3 hum | PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV | | | | |
| IgG4 hum | PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV | | | | |
| IgG1mur | ---TVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFNWYV | | | | |
| IgG2Amur | PAPNLLGGPSVFI FPPKPKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWYV | | | | |
| IgG2Bmur | PAPNLEGGPSVFI FPPNPKDVLMI SLPKVTTCVVVDVSEDDPDVQISWYV | | | | |
| IgG3mur | PPGNILGGPSVFI FPPKPKDALMI SLPKVTTCVVVDVSEDDPDVHVSWYV | | | | |
| | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
| IgG1 hum | DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLVHQQDWLNGKEYCKCKVSNKALP | | | | |
| IgG2 hum | DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VLVHQQDWLNGKEYCKCKVSNKGLP | | | | |
| IgG3 hum | DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VLVHQQDWLNGKEYCKCKVSNKALP | | | | |
| IgG4 hum | DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLVHQQDWLNGKEYCKCKVSNKGLP | | | | |
| IgG1mur | DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDCLNGKEFKCRVNSAAFP | | | | |
| IgG2Amur | NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVMNKKDLP | | | | |
| IgG2Bmur | NNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSHP LPIQHQQDWMSGKEFKCKVMNKKDLP | | | | |
| IgG3mur | DNKEVHTAQTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQQDWMRGKEFKCKVMNKKALP | | | | |
| | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 |
| IgG1 hum | APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV | | | | |
| | | | | D L | |
| IgG2 hum | APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV | | | | |
| IgG3 hum | APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV | | | | |
| IgG4 hum | SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV | | | | |
| IgG1mur | APIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCLMIDDFPEDITV | | | | |
| IgG2Amur | APIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCLMIDDFMPEDIV | | | | |
| IgG2Bmur | SPIERTISKPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGDFNPGDISV | | | | |
| IgG3mur | APIERTISKPKGRAQTPQVYTI PPPPREQMSKKKVSLTCLVITNFFSEAISV | | | | |
| | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| IgG1 hum | EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH | | | | |
| IgG2 hum | EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH | | | | |
| IgG3 hum | EWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH | | | | |
| IgG4 hum | EWZSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSQSVMH | | | | |
| IgG1mur | EWQWNGQPAENYKNTQPI MDTDGSYFVYSKLNVOKSNWEAGNTITCSVLH | | | | |
| IgG2Amur | EWTNNGKTELNKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH | | | | |
| IgG2Bmur | EWT'SNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFLYSKLNMT'SKWEKTD'SFSCNVRH | | | | |
| IgG3mur | EWERNGELEQDYKNTPPIL DSDGTYFLYSKLTFVDTDSWLQGEI F' TCSVVH | | | | |
| | 430 | 440 | | | |
| IgG1 hum | EALHNHYTQKSLSLSPGK | | | | |
| IgG2 hum | EALHNHYTQKSLSLSPGK | | | | |
| IgG3 hum | EALHNRF'TQKSLSLSPGK | | | | |
| IgG4 hum | EALHNHYTQKSLSLSLGK | | | | |
| IgG1mur | EGLHNHHTKSLSHSPGK | | | | |
| IgG2Amur | EGLHNHHTKSF SRTPGK | | | | |
| IgG2Bmur | EGLKNYLLKKTISRSPGK | | | | |
| IgG3mur | EALHNHHTQKNLSRSPGK | | | | |

FIG. 3

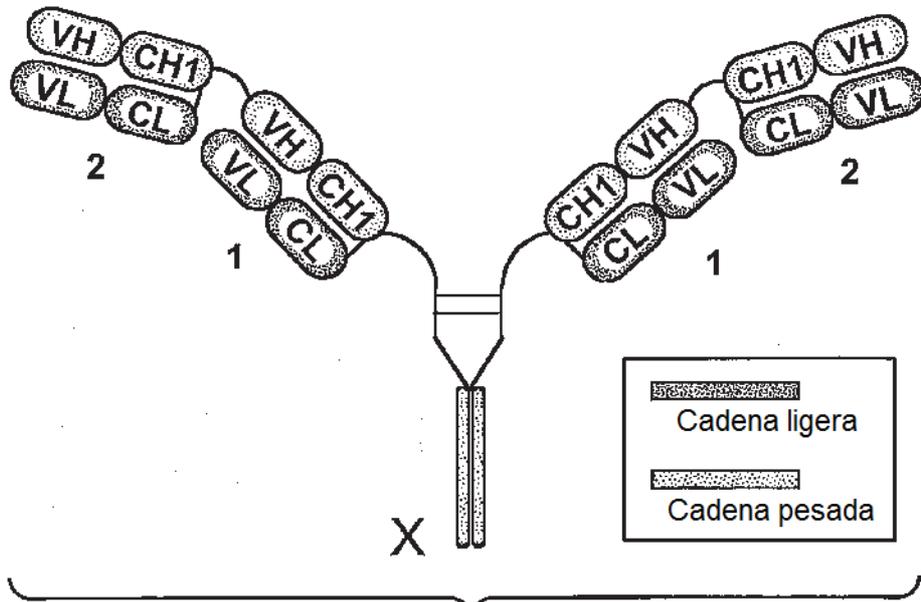


FIG. 4A

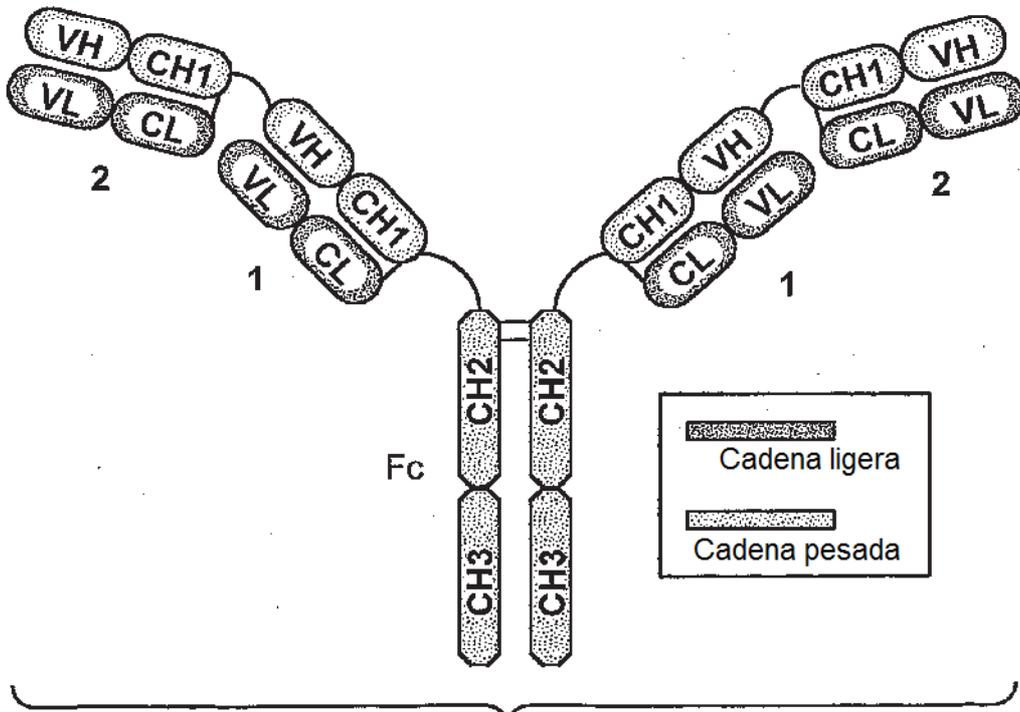


FIG. 4B

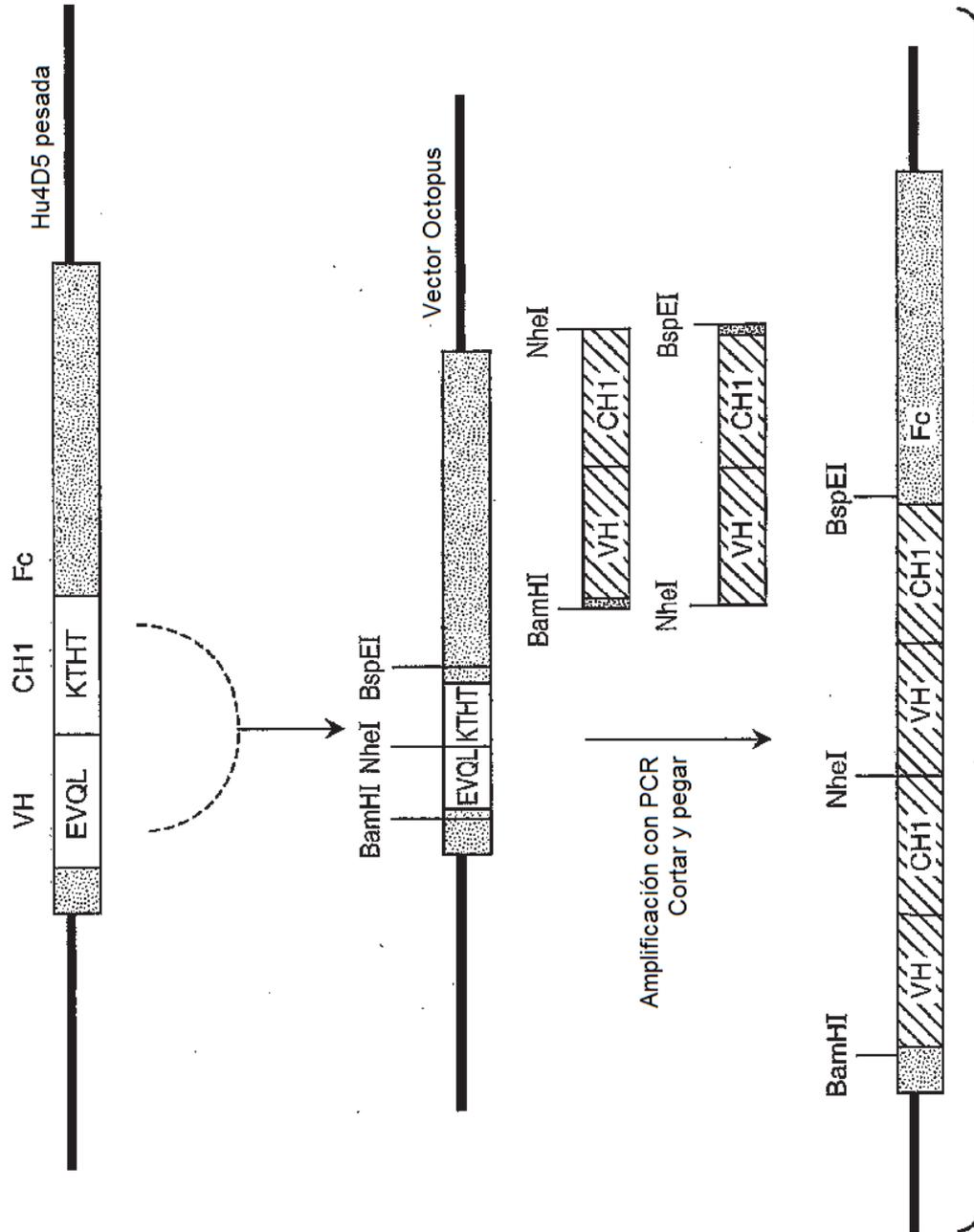
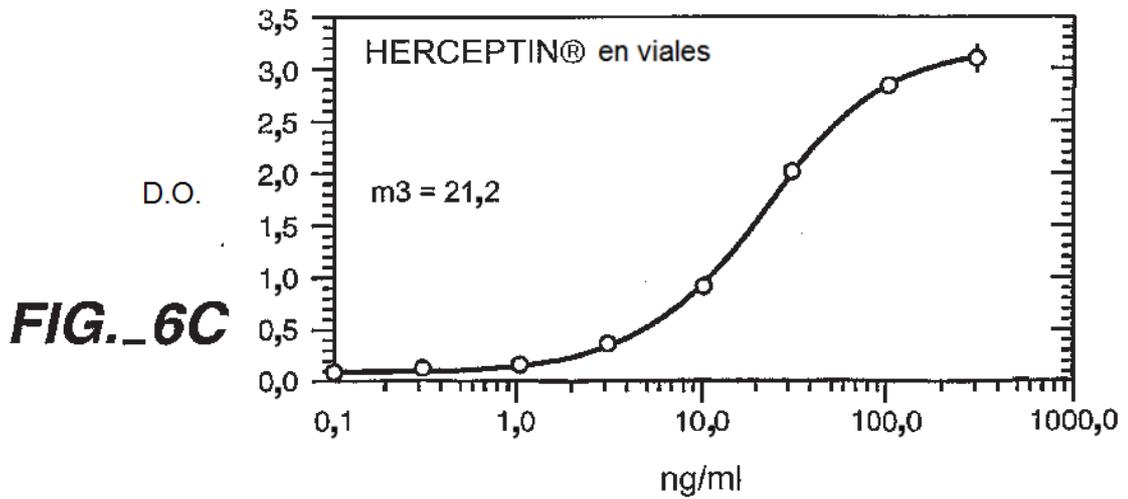
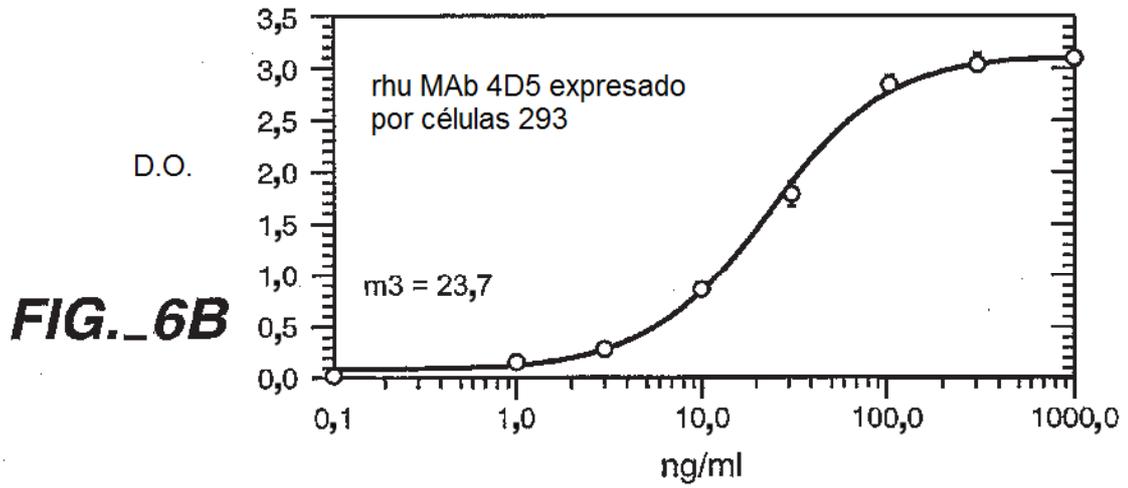
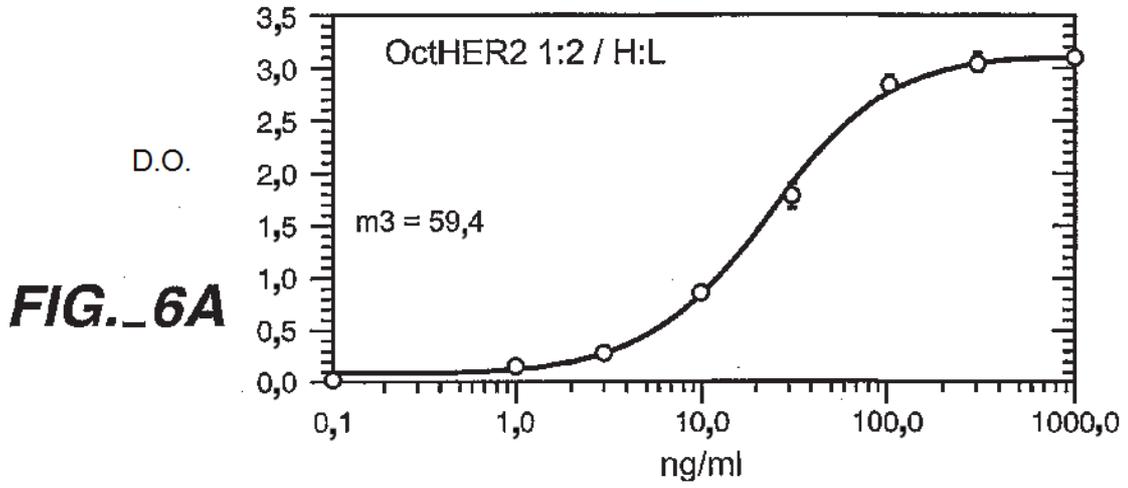


FIG._5



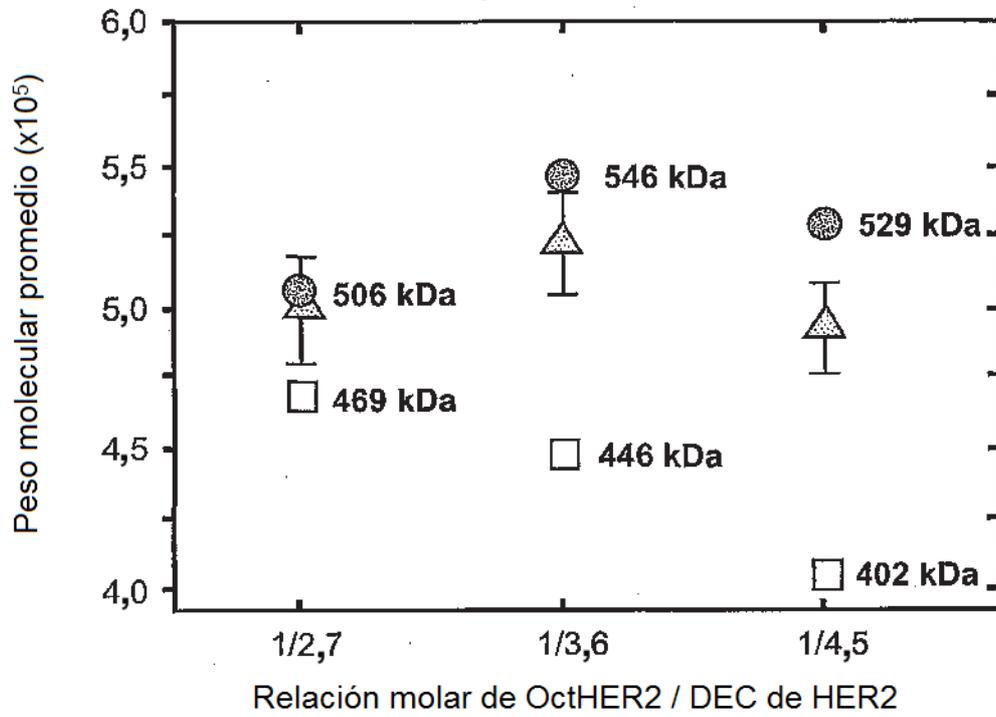


FIG._7

FIG. 8A

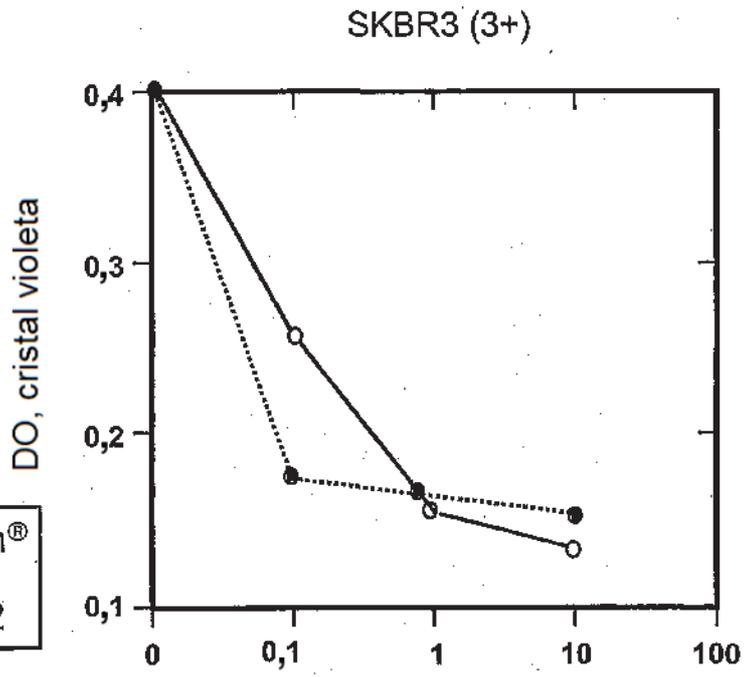
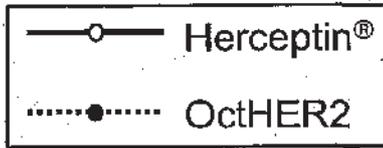


FIG. 8B

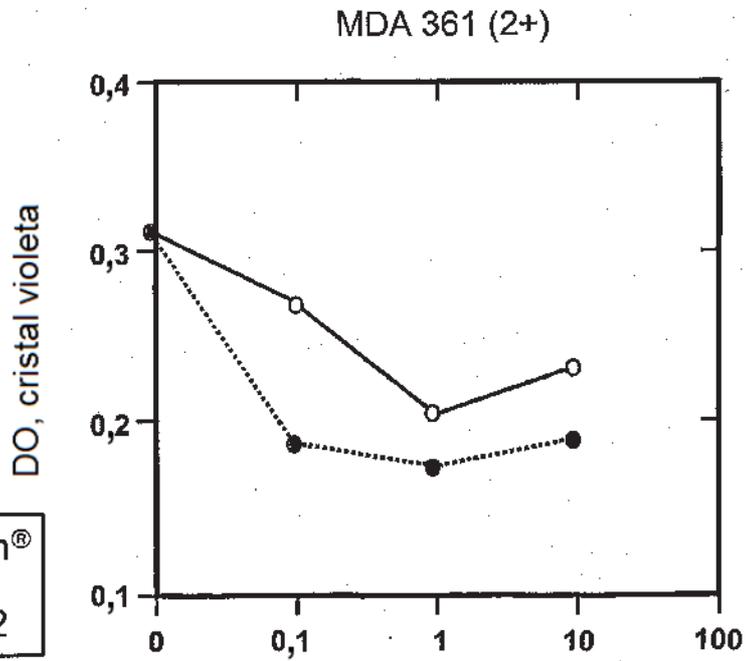
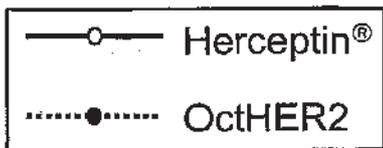


FIG. 8C

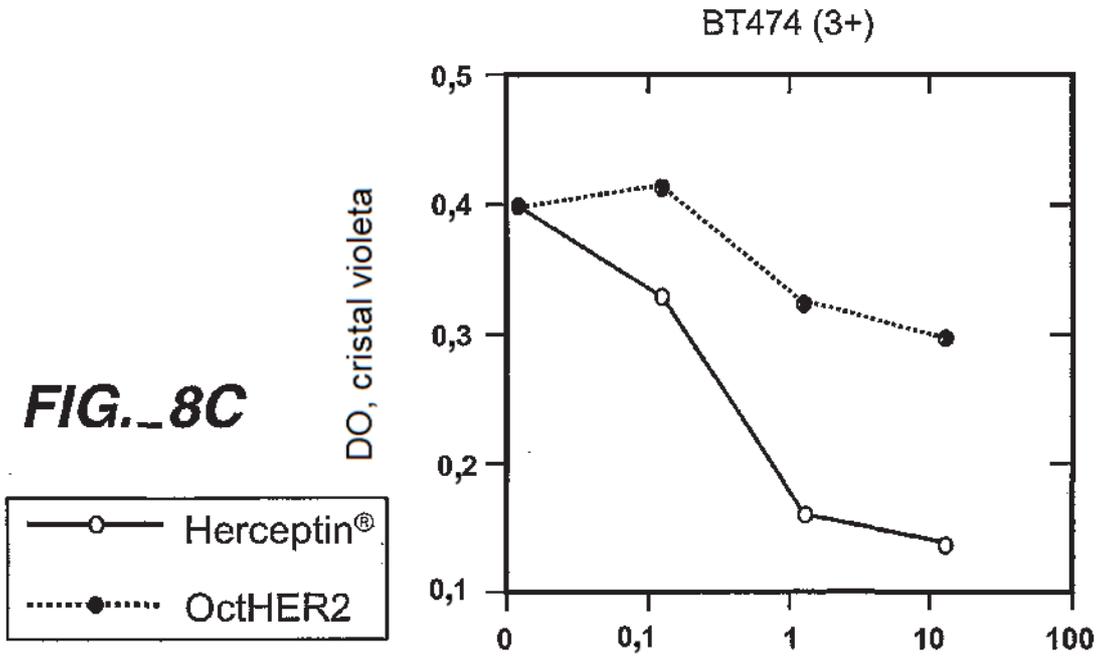
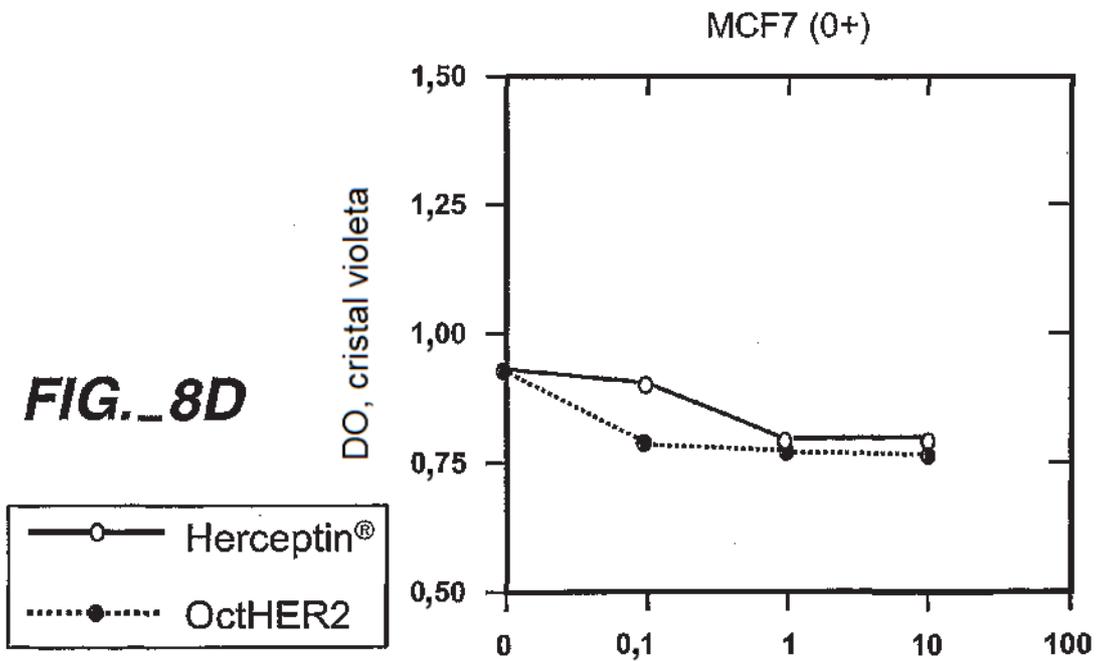


FIG. 8D



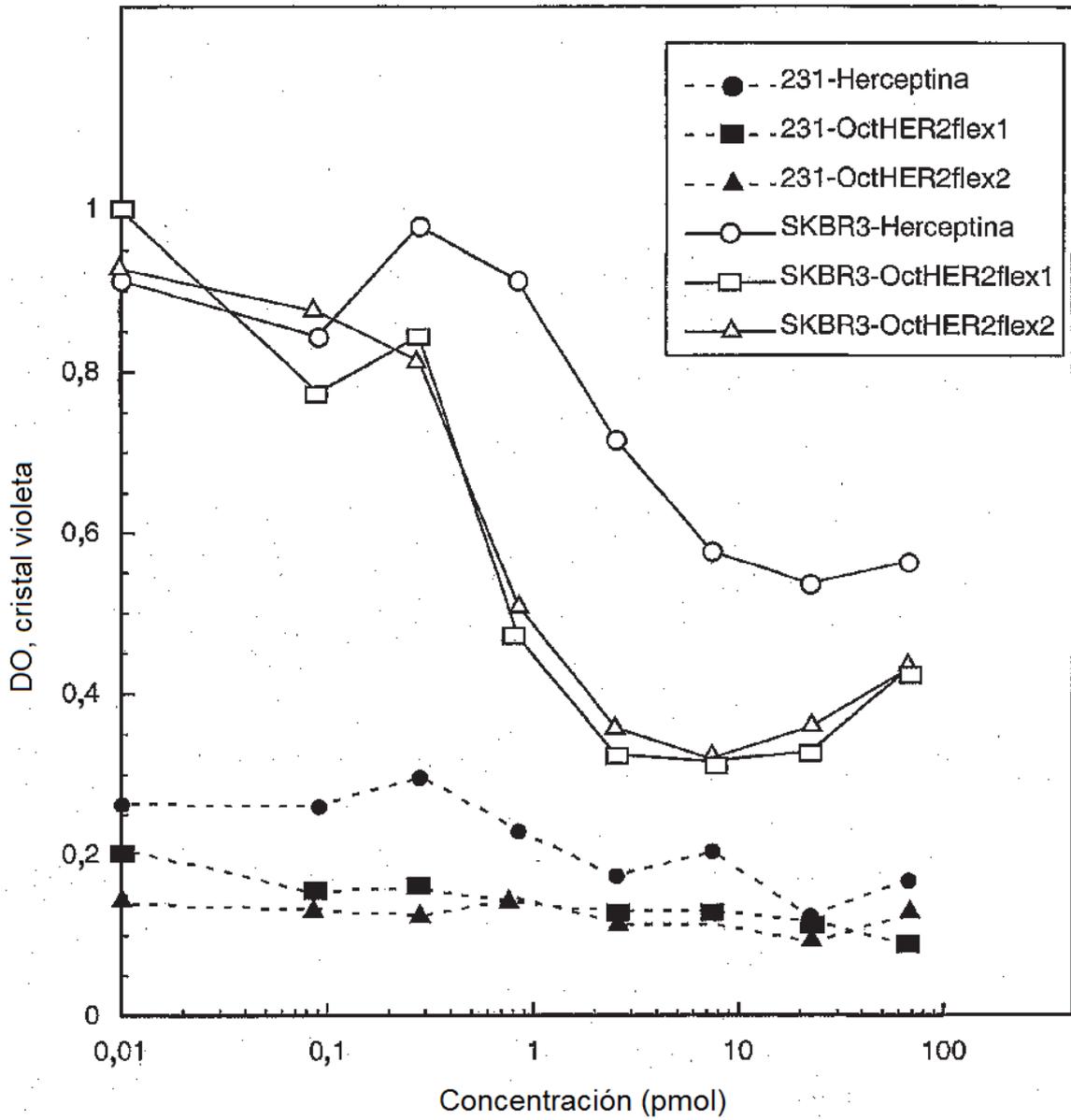


FIG. 9

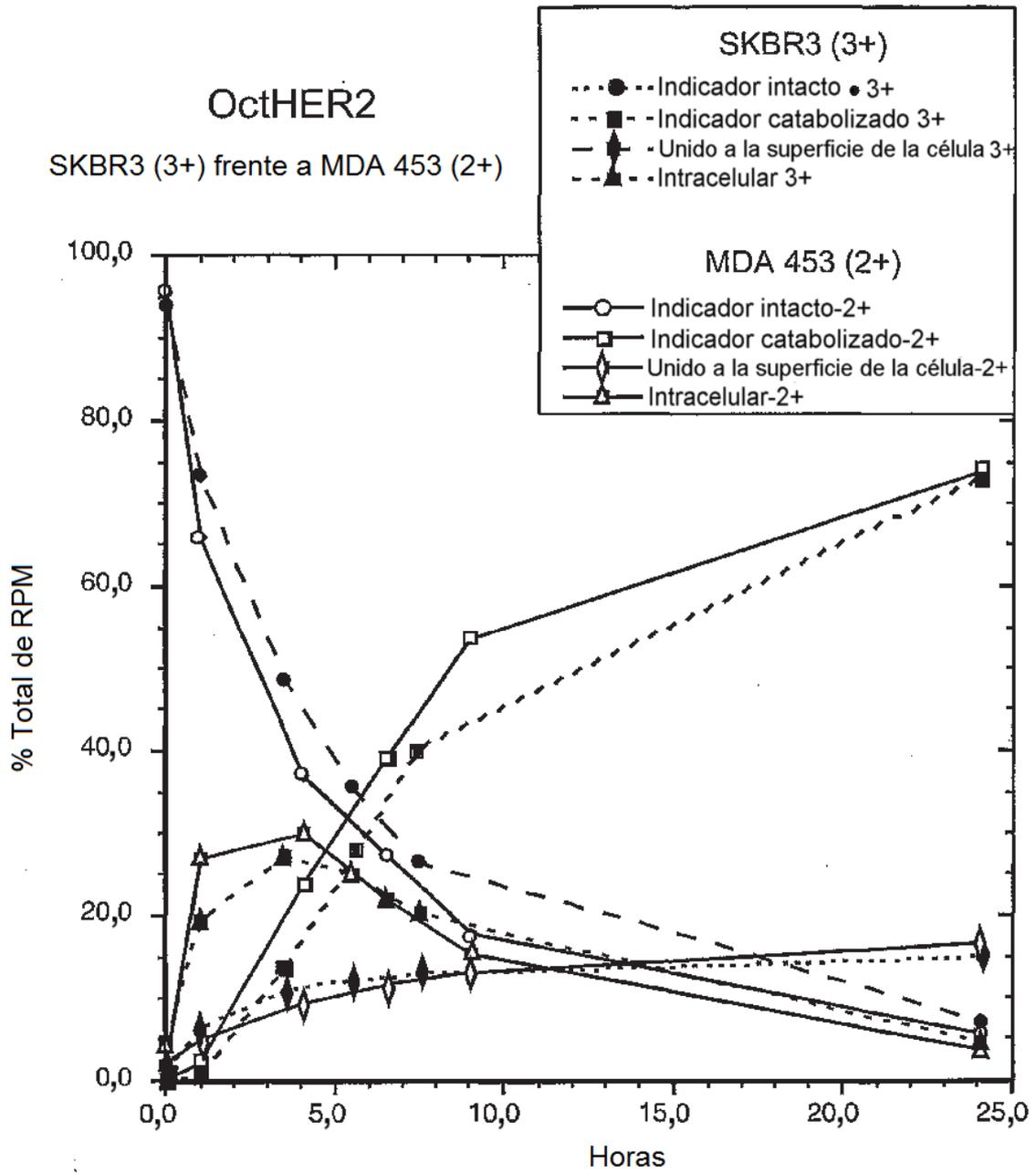


FIG. 10A

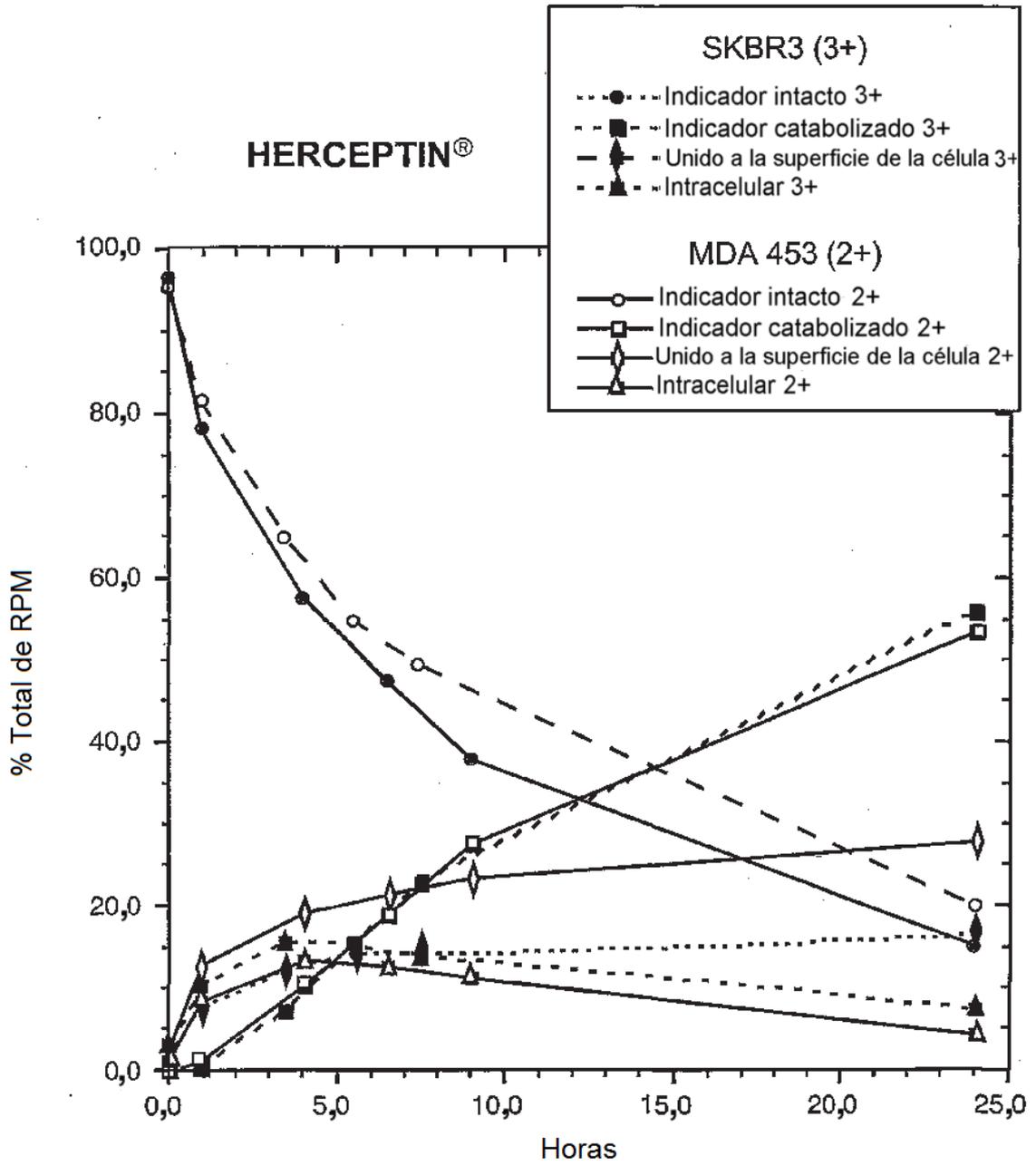


FIG. 10B

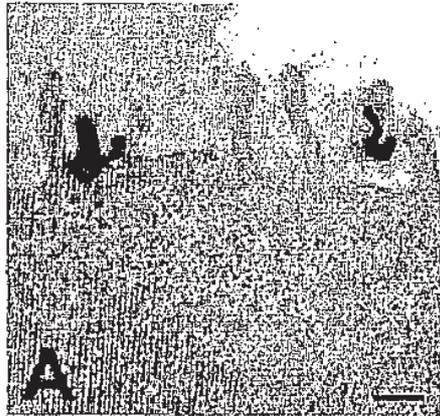


FIG. 11A

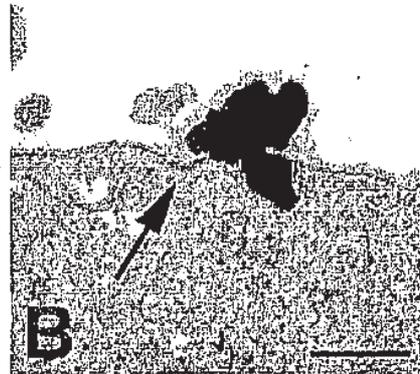


FIG. 11B

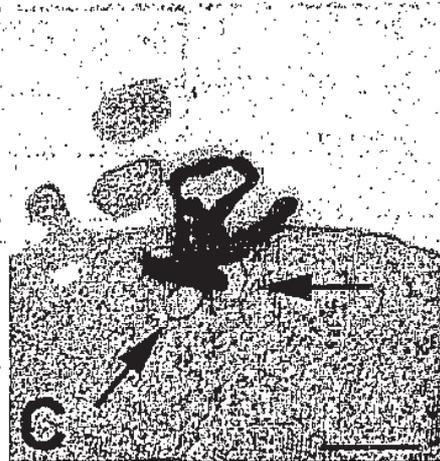


FIG. 11C

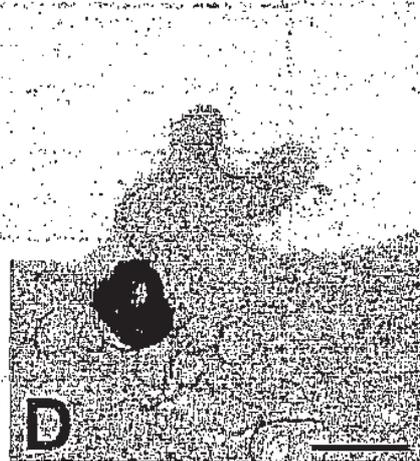


FIG. 11D

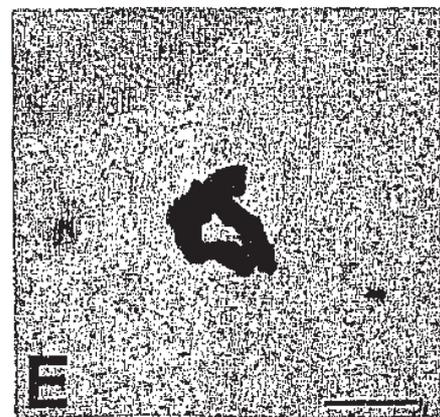


FIG. 11E

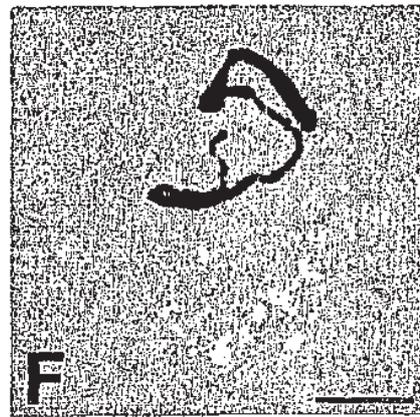


FIG. 11F

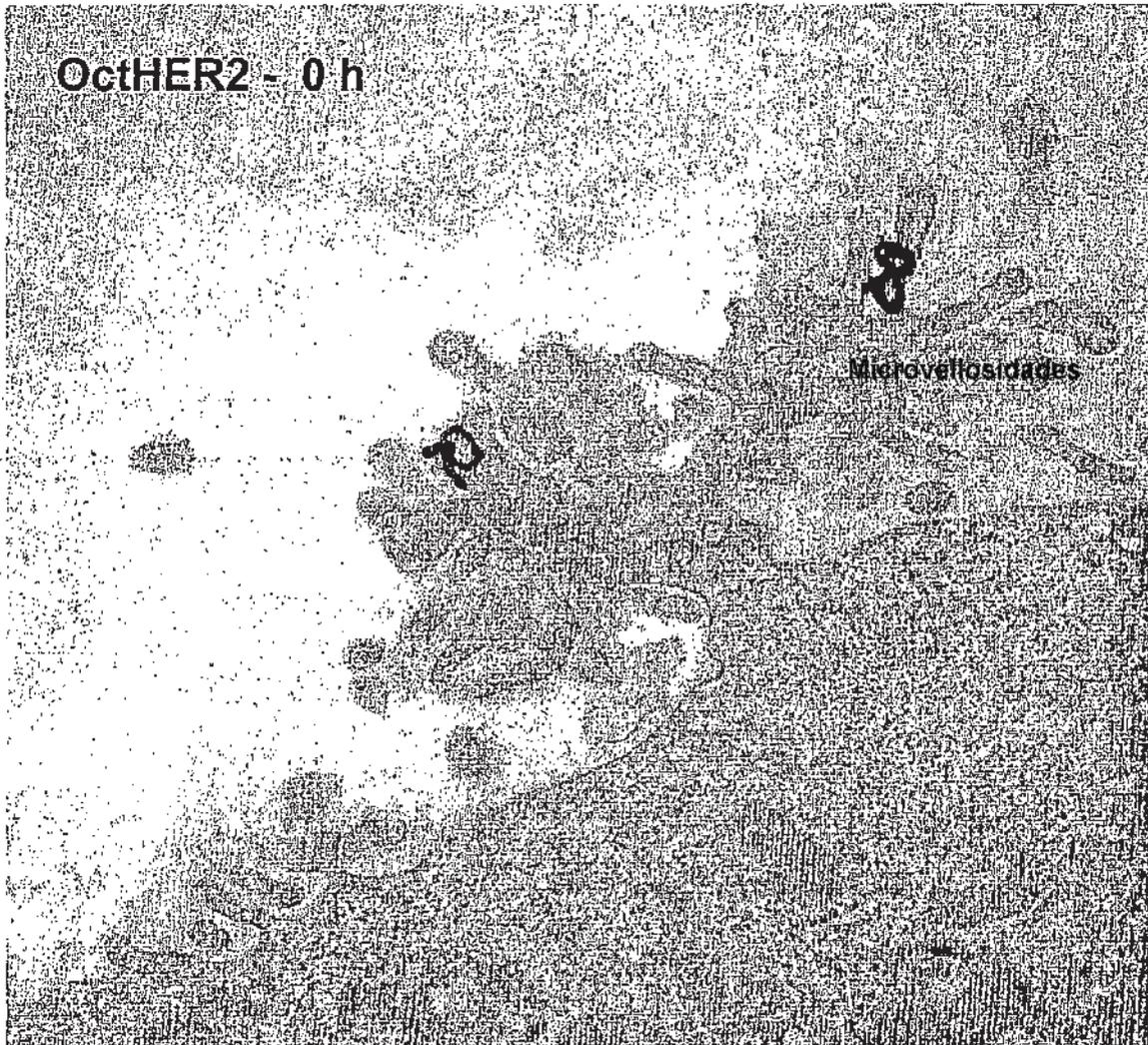


FIG. 11G

OctHER2 - 5 h

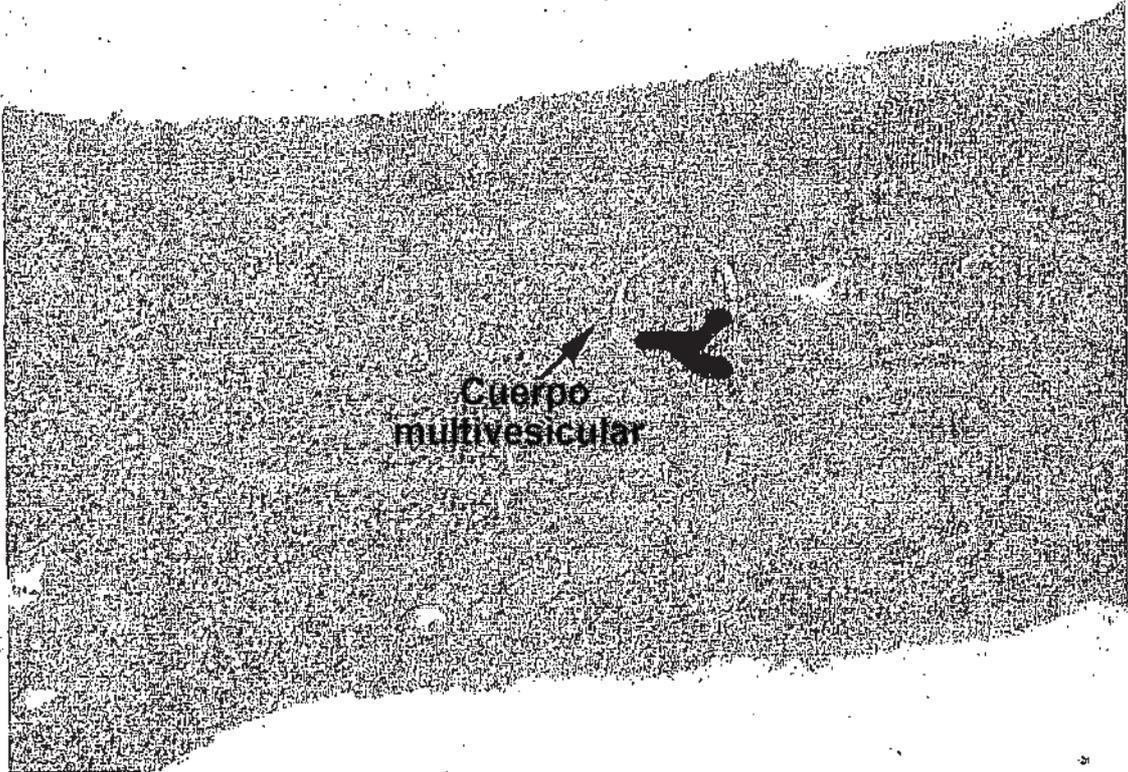


FIG. 11H

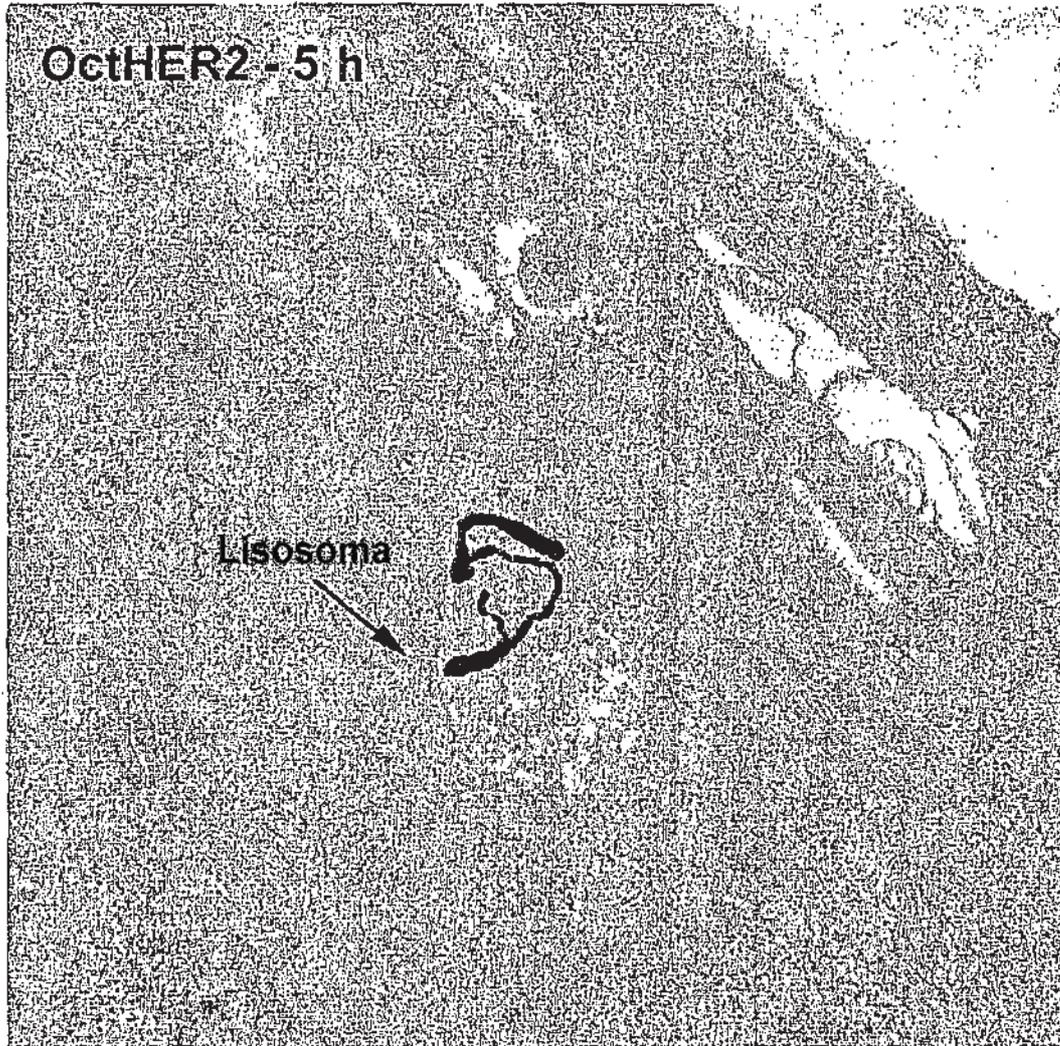


FIG. 111

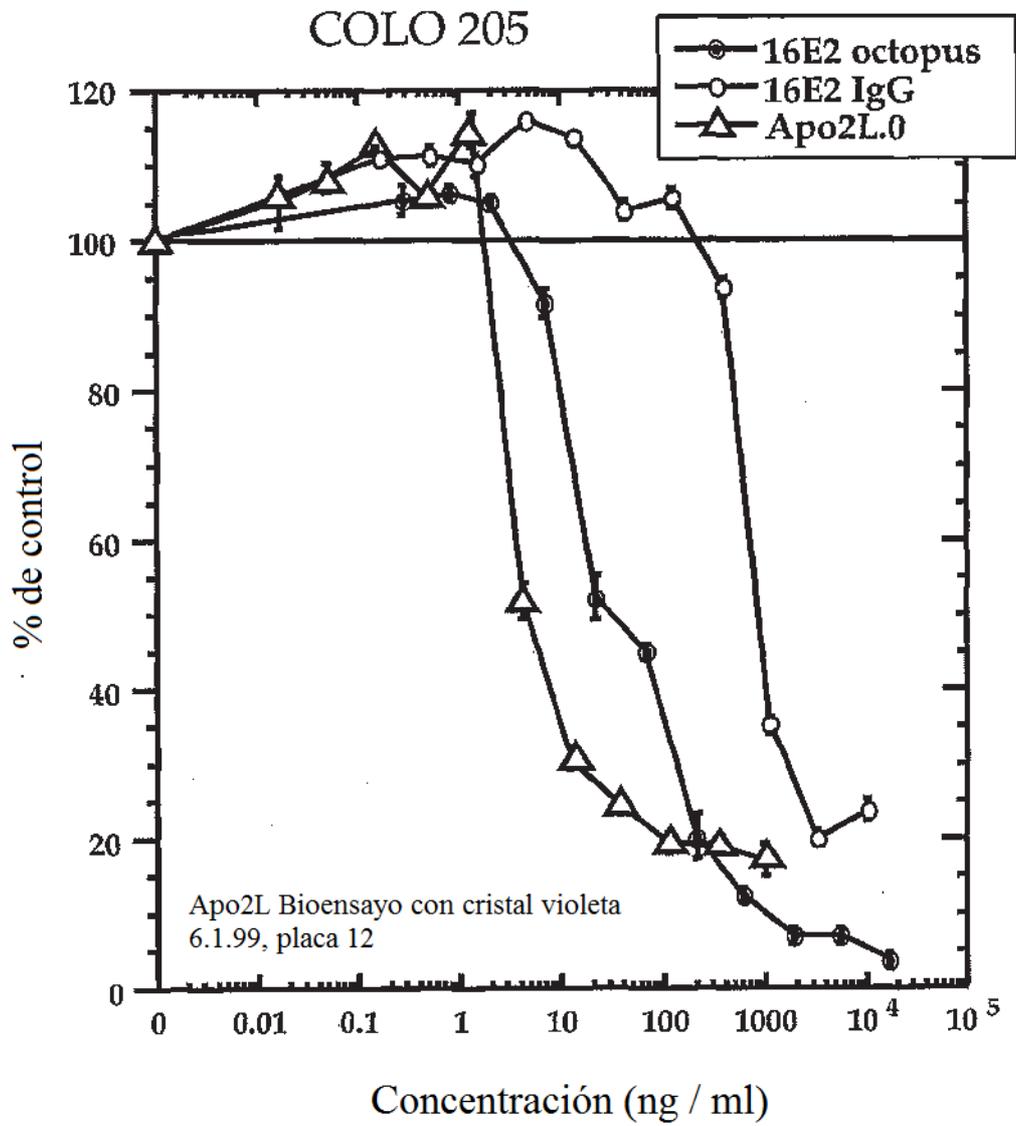


FIG. 12A

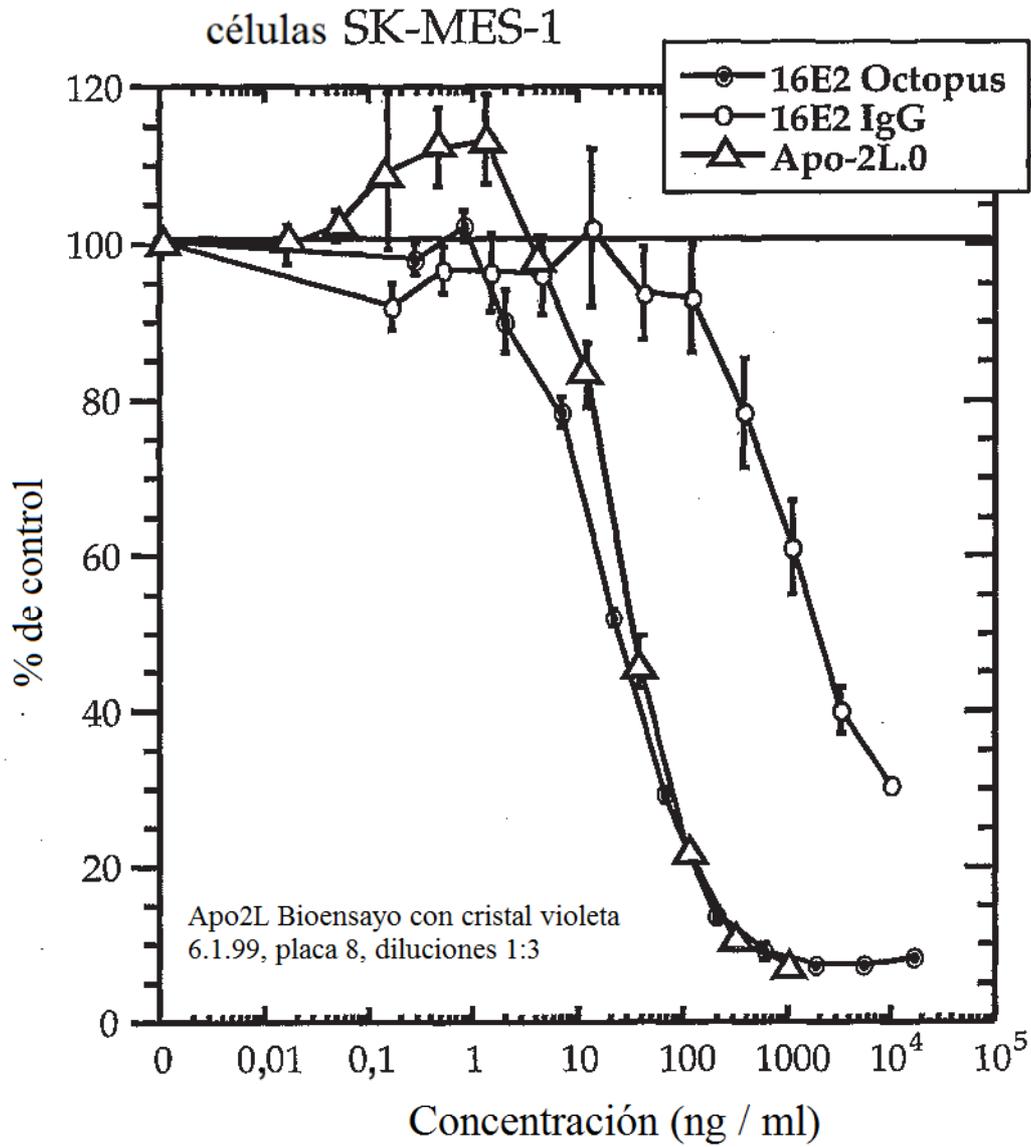


FIG. 12B

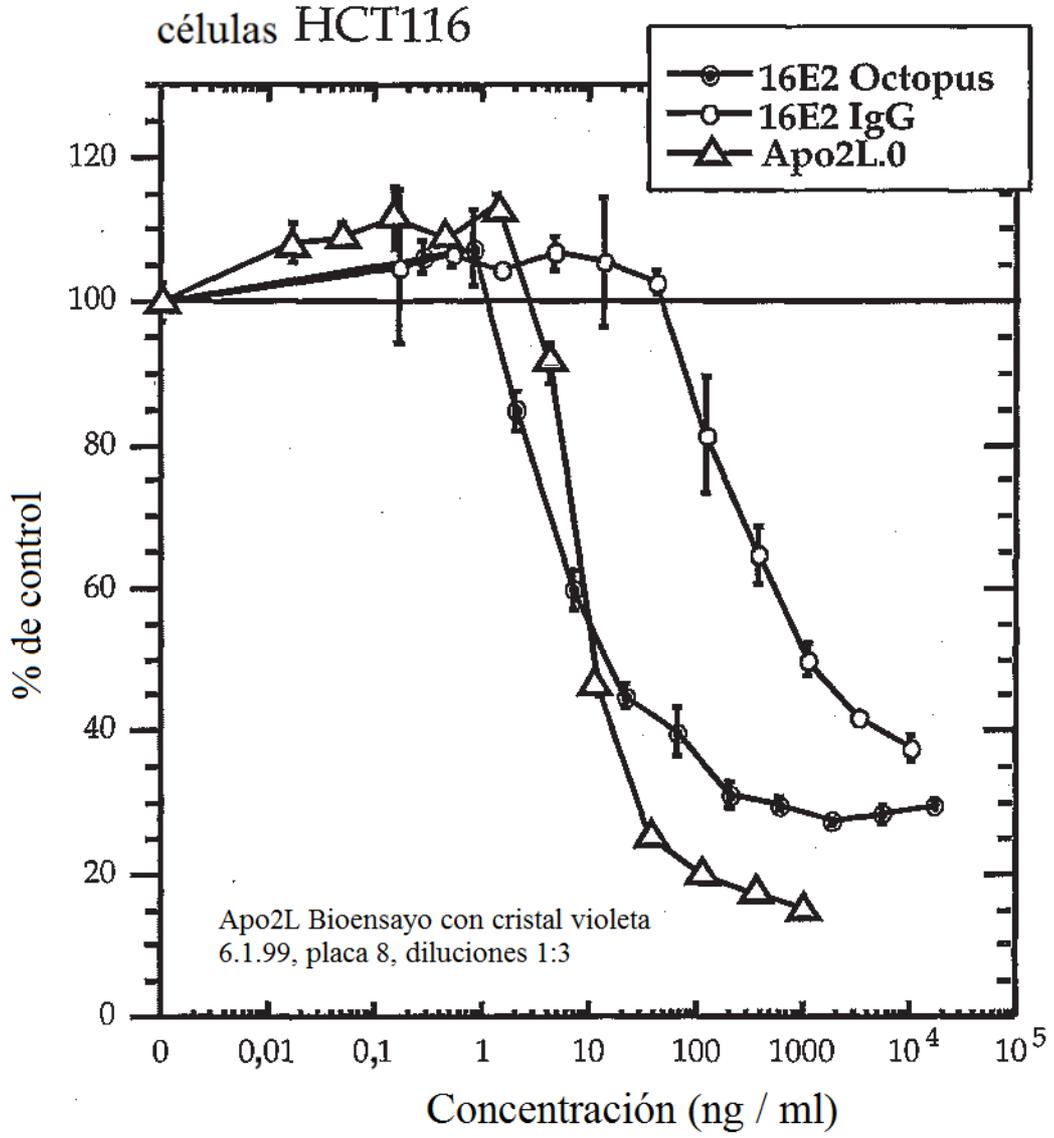
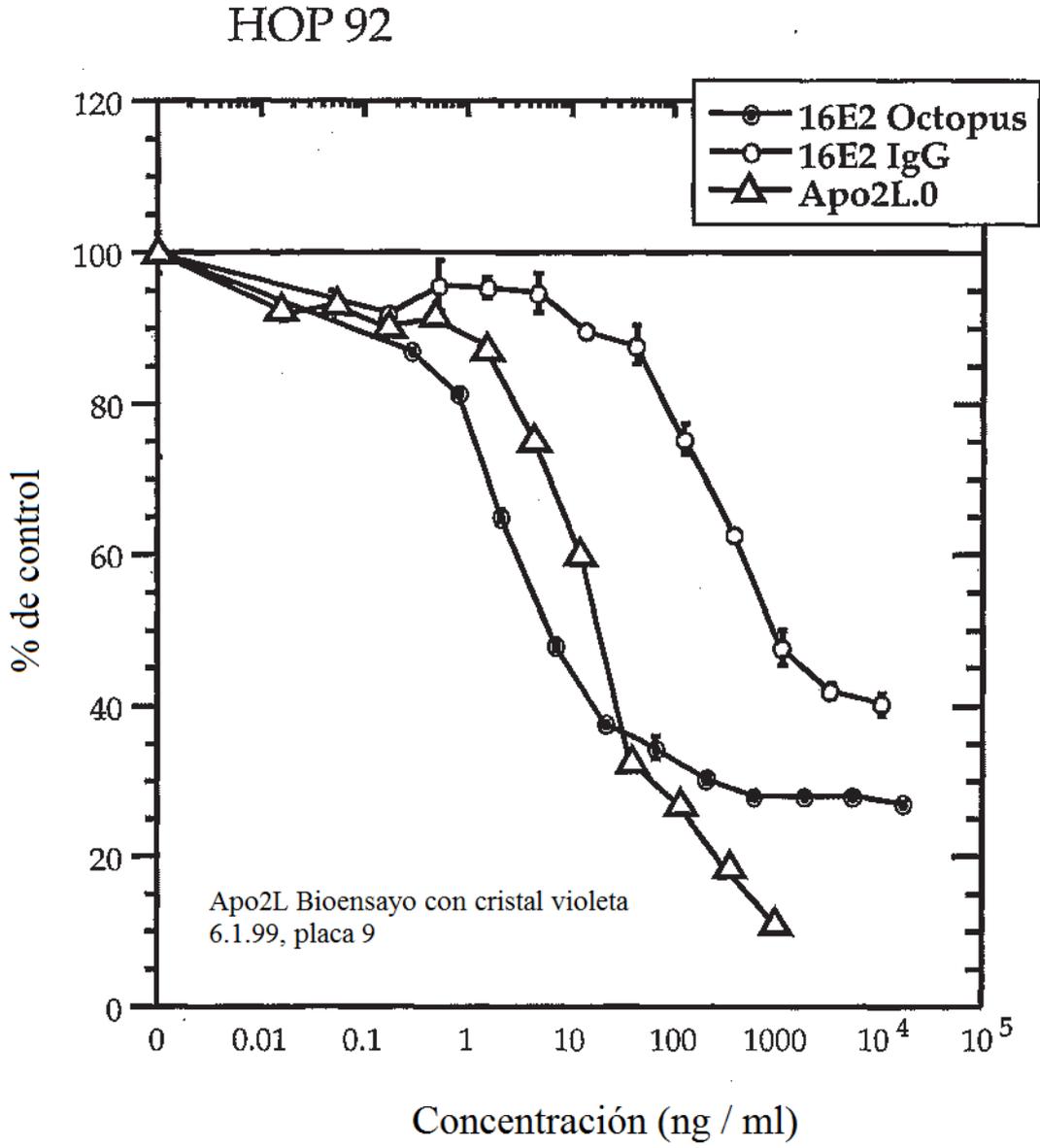


FIG. 12C



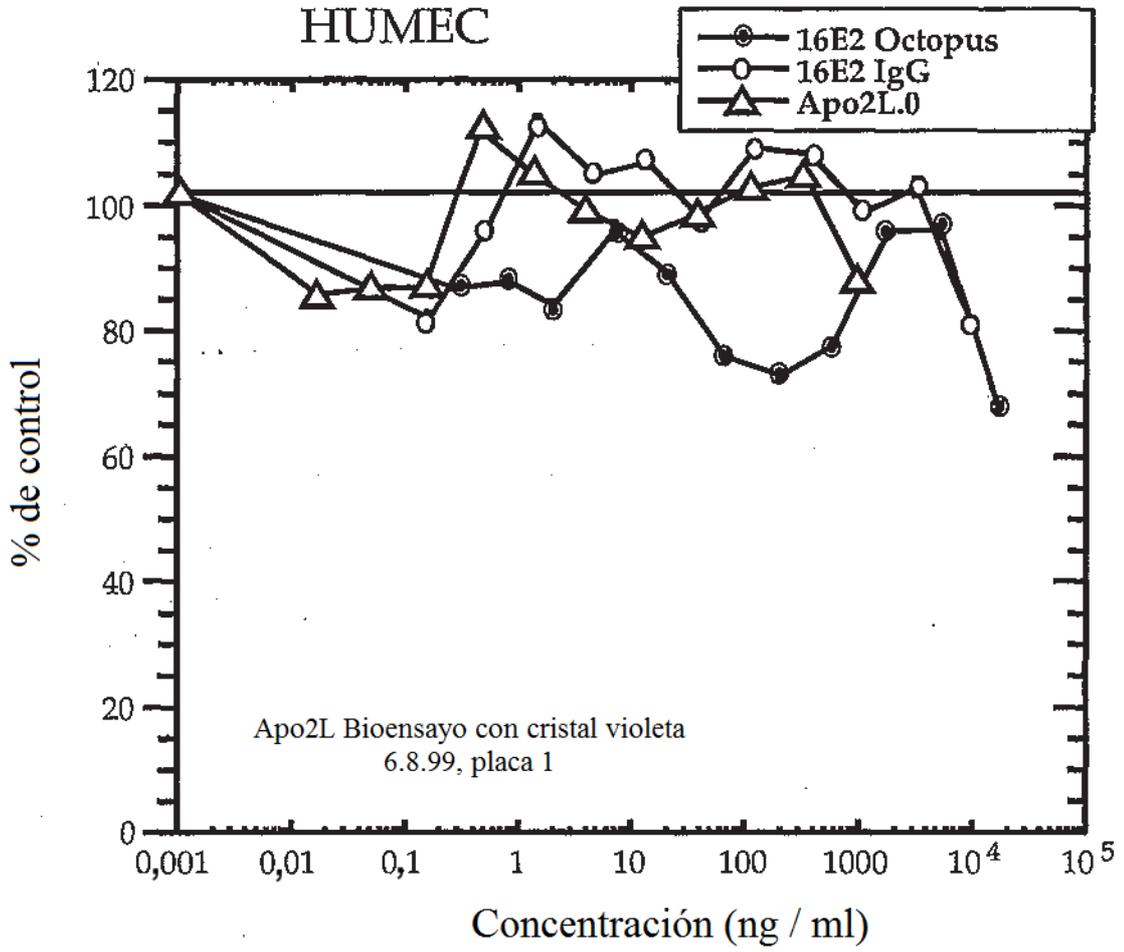


FIG. 12E

FIG. 13C

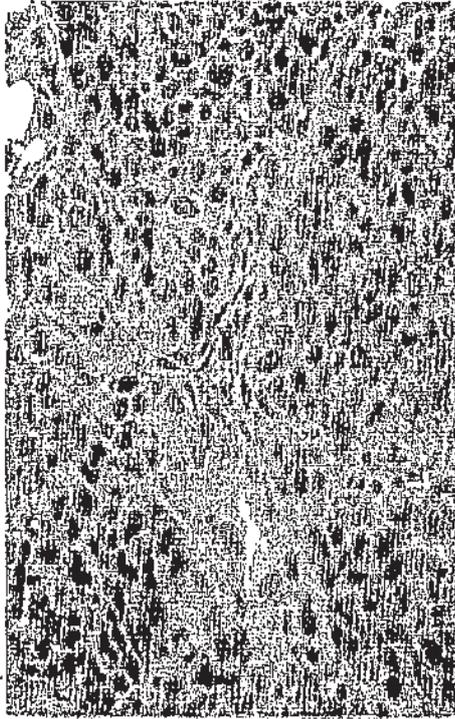


FIG. 13D

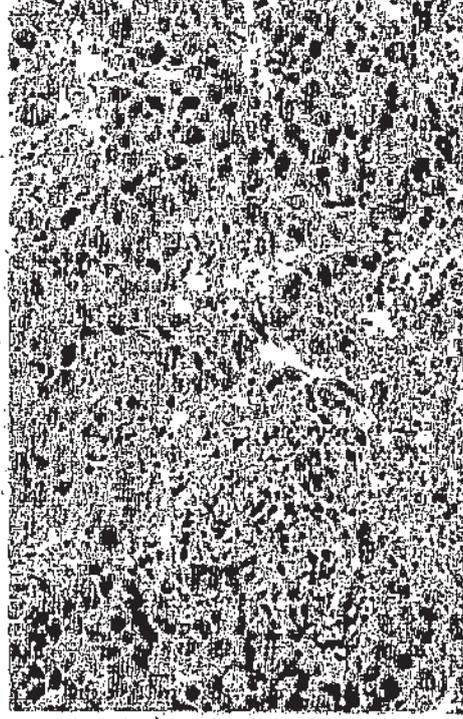


FIG. 13A

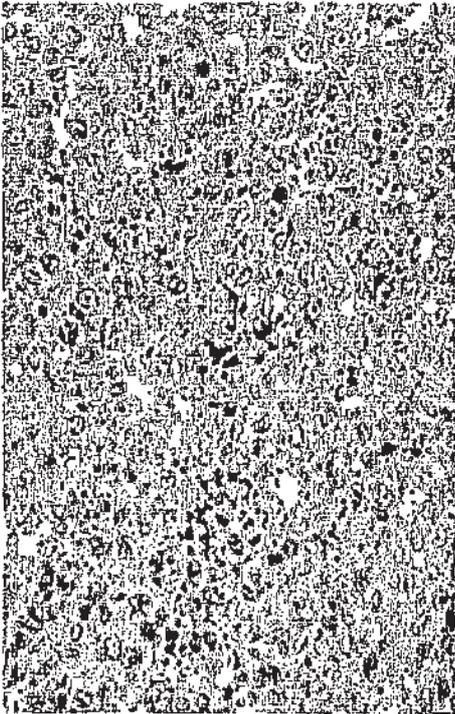
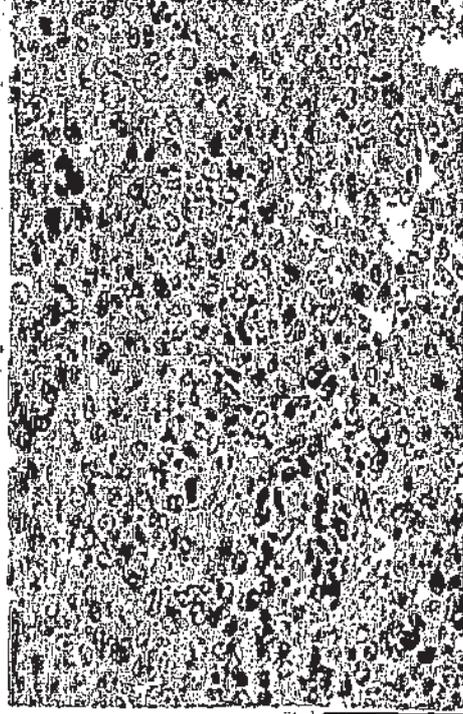
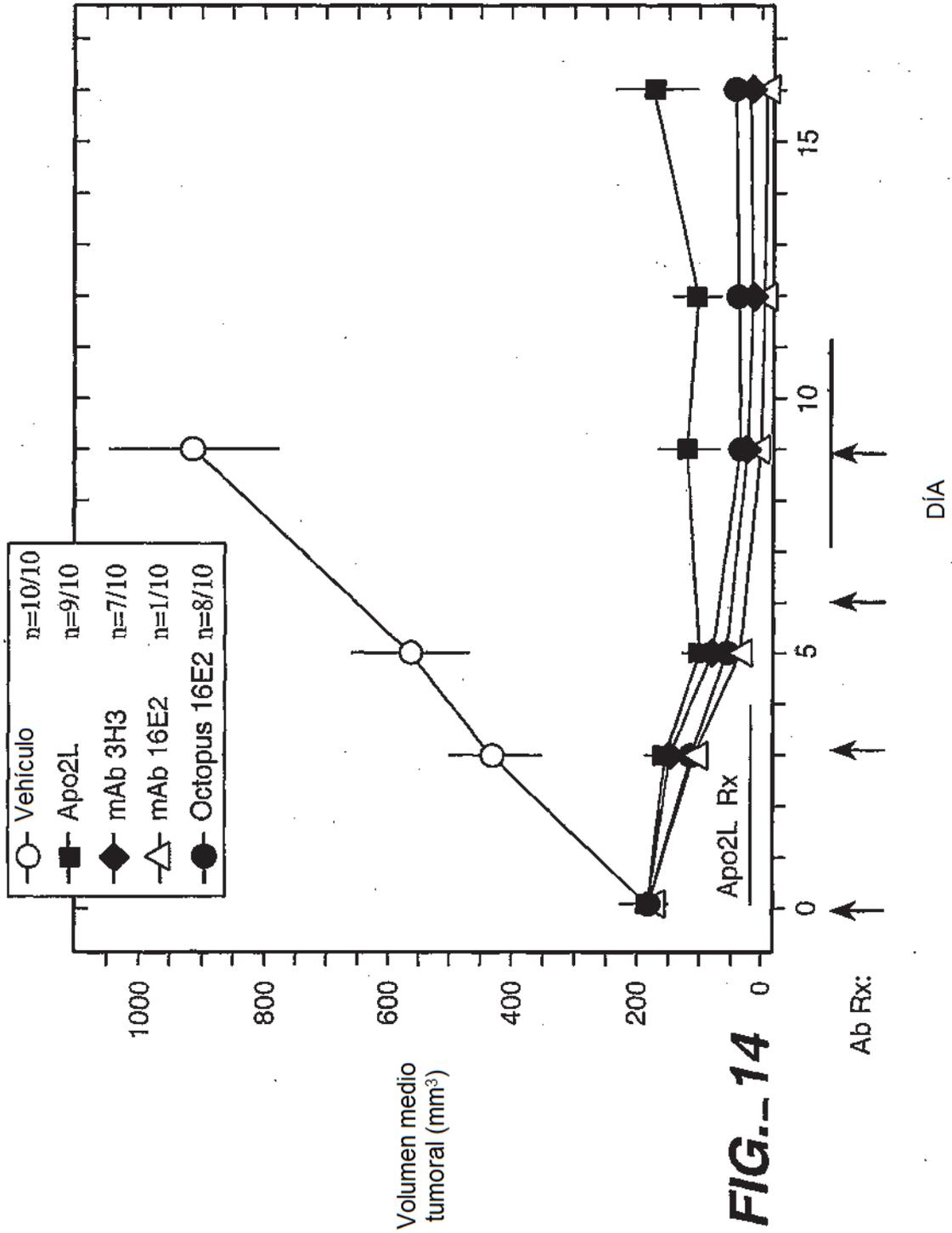


FIG. 13B





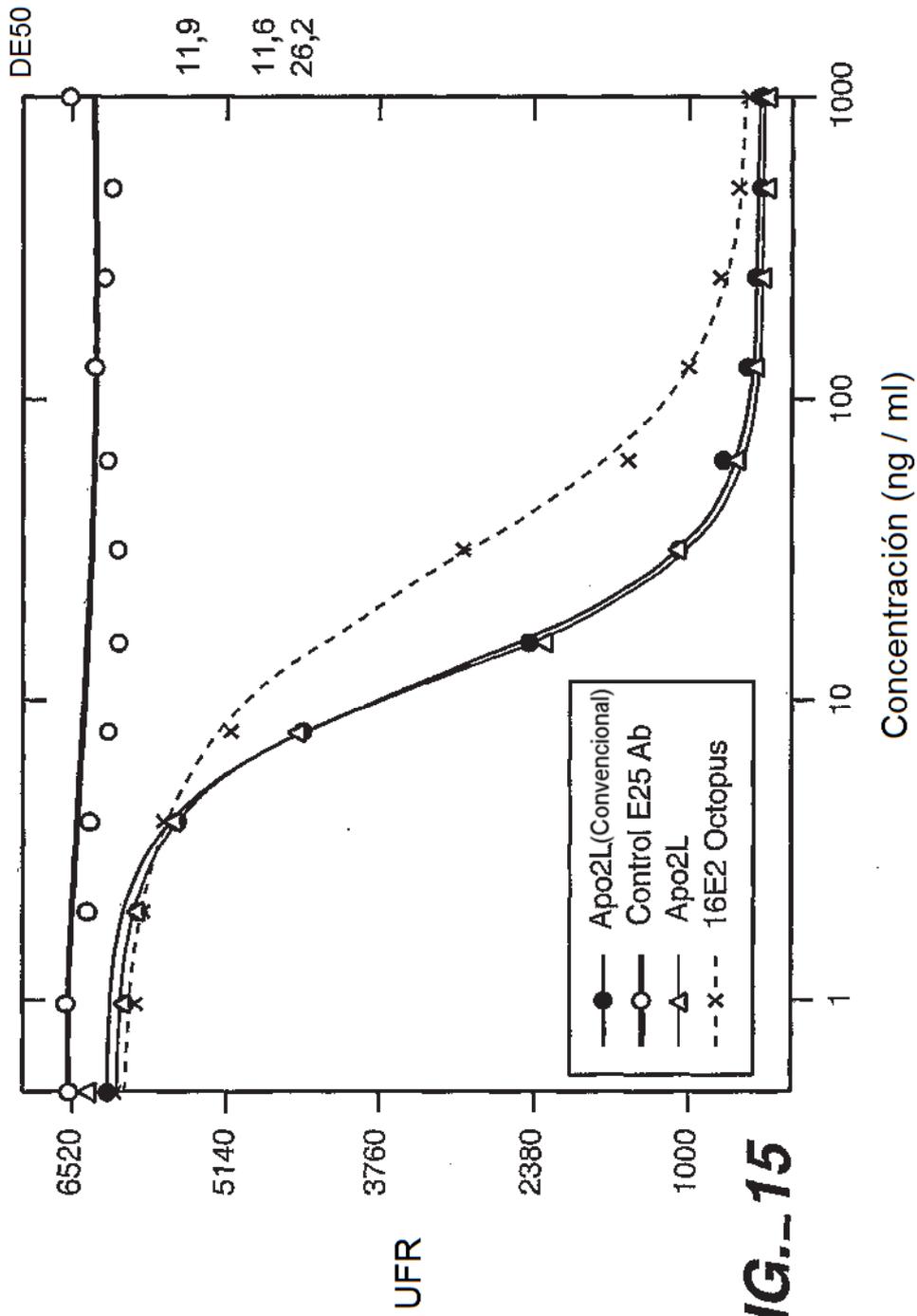


FIG. 15

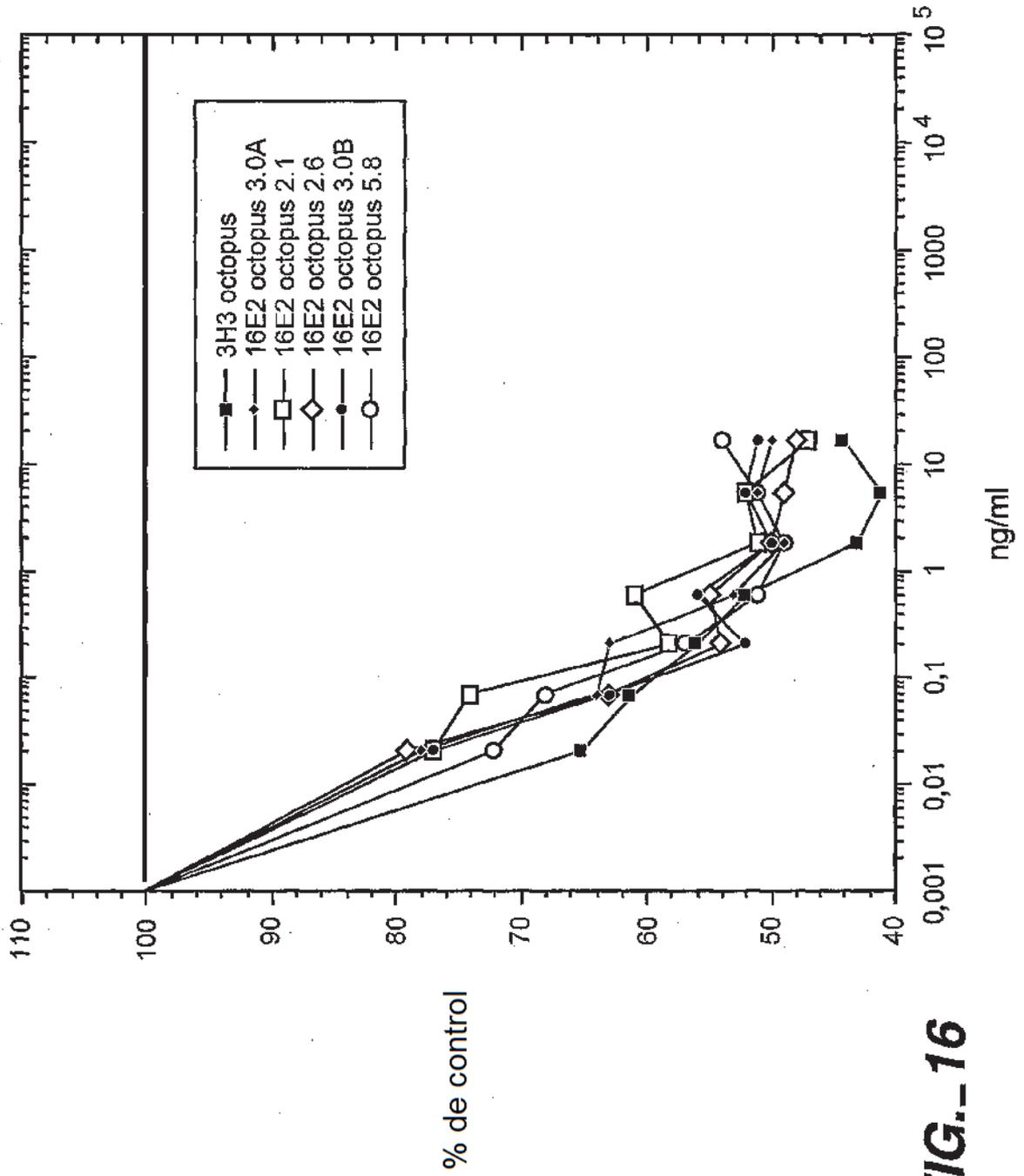


FIG._16

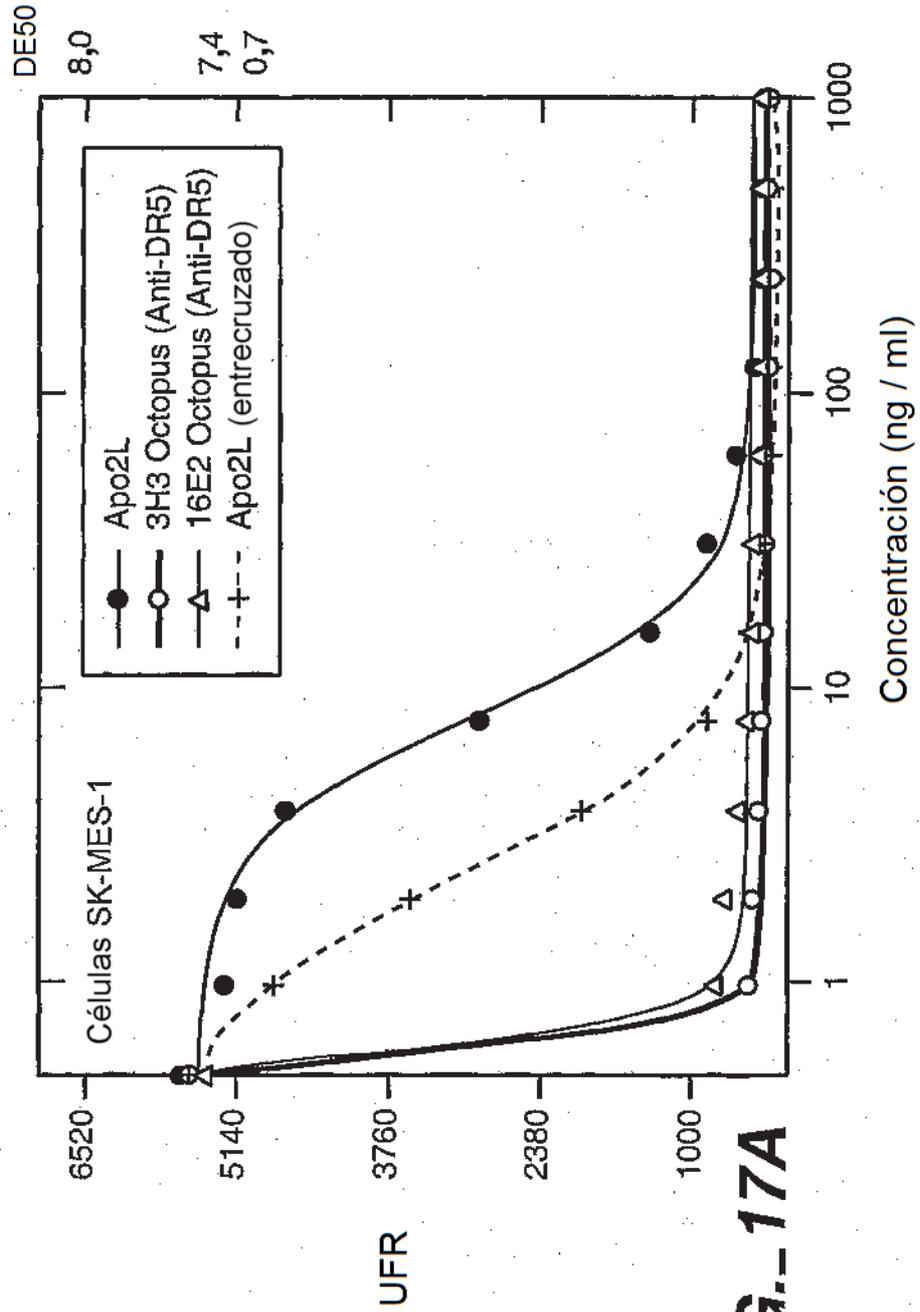


FIG. 17A

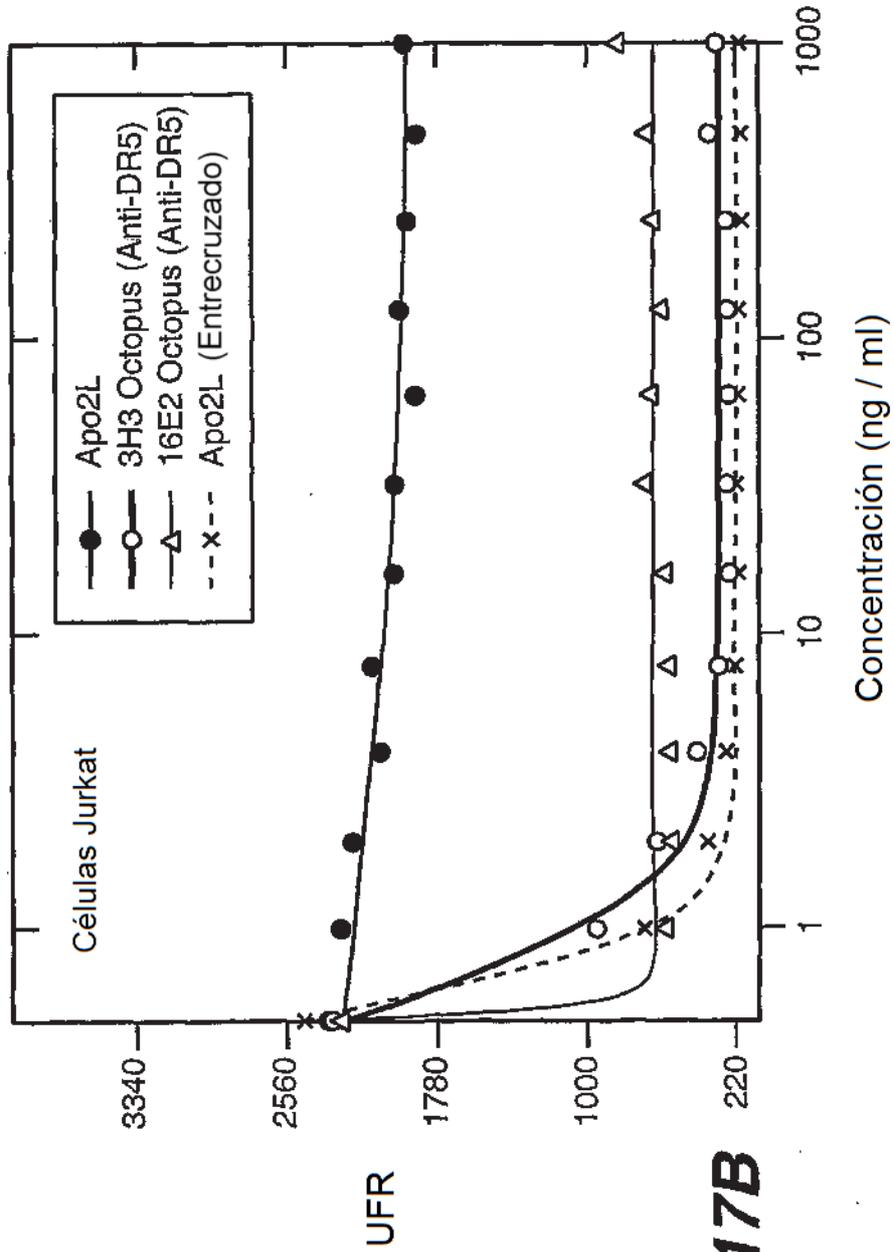
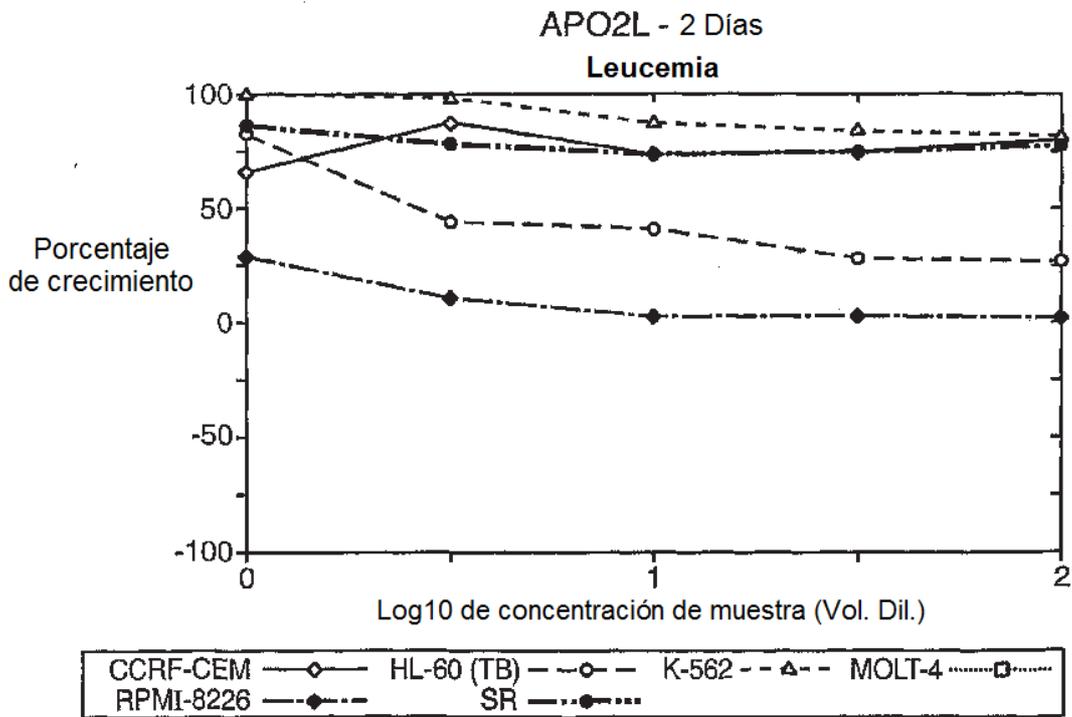
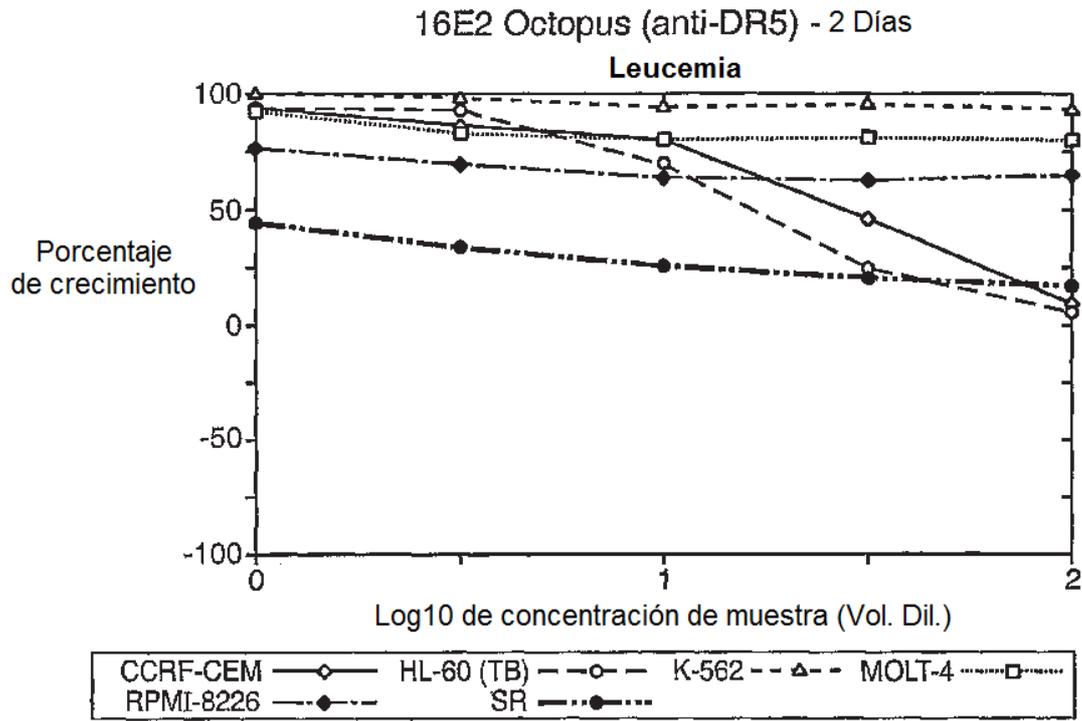


FIG. 17B



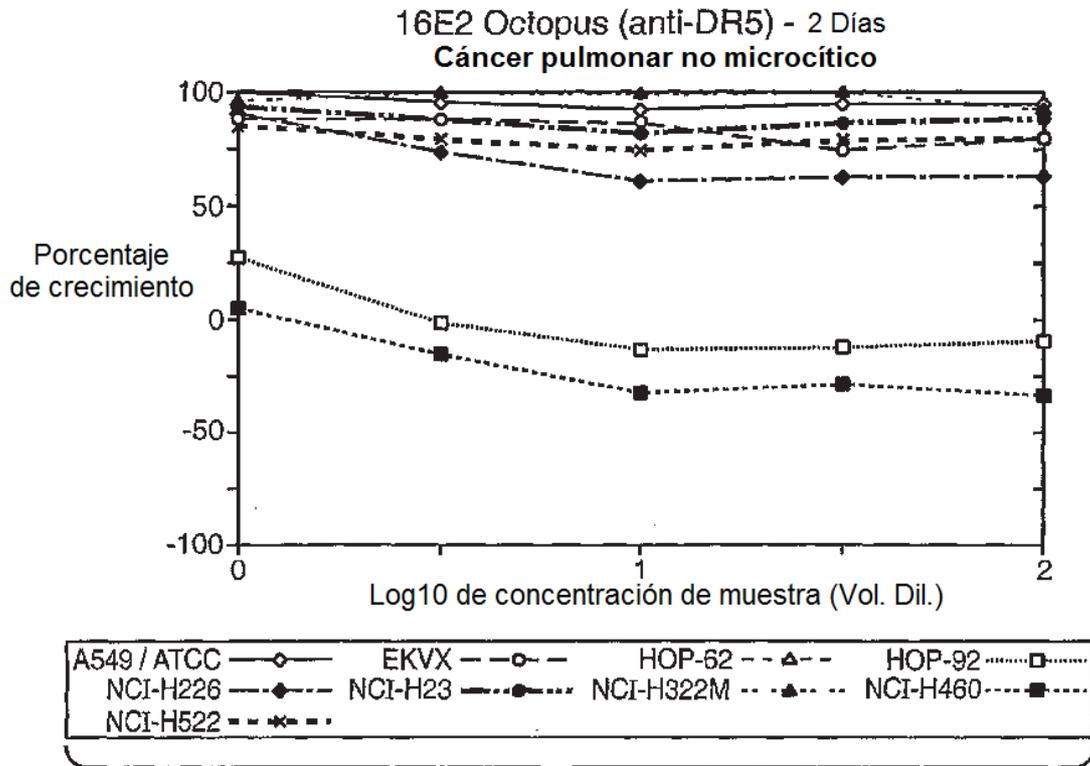


FIG. 18A-3

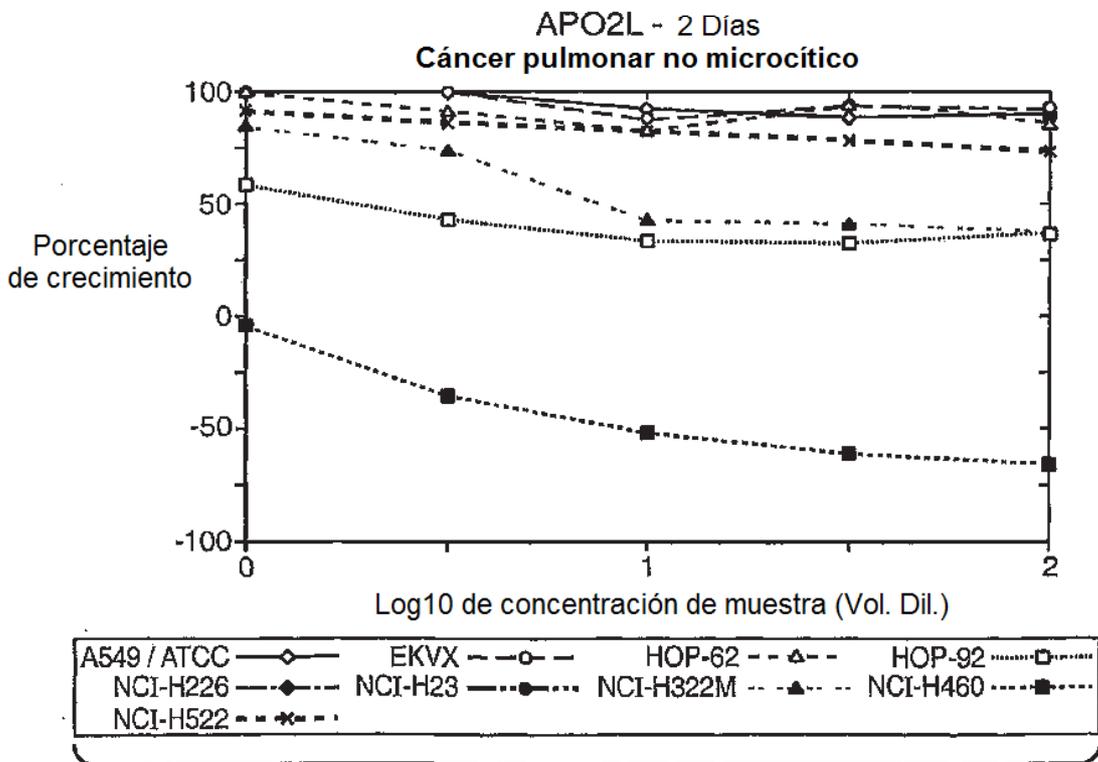
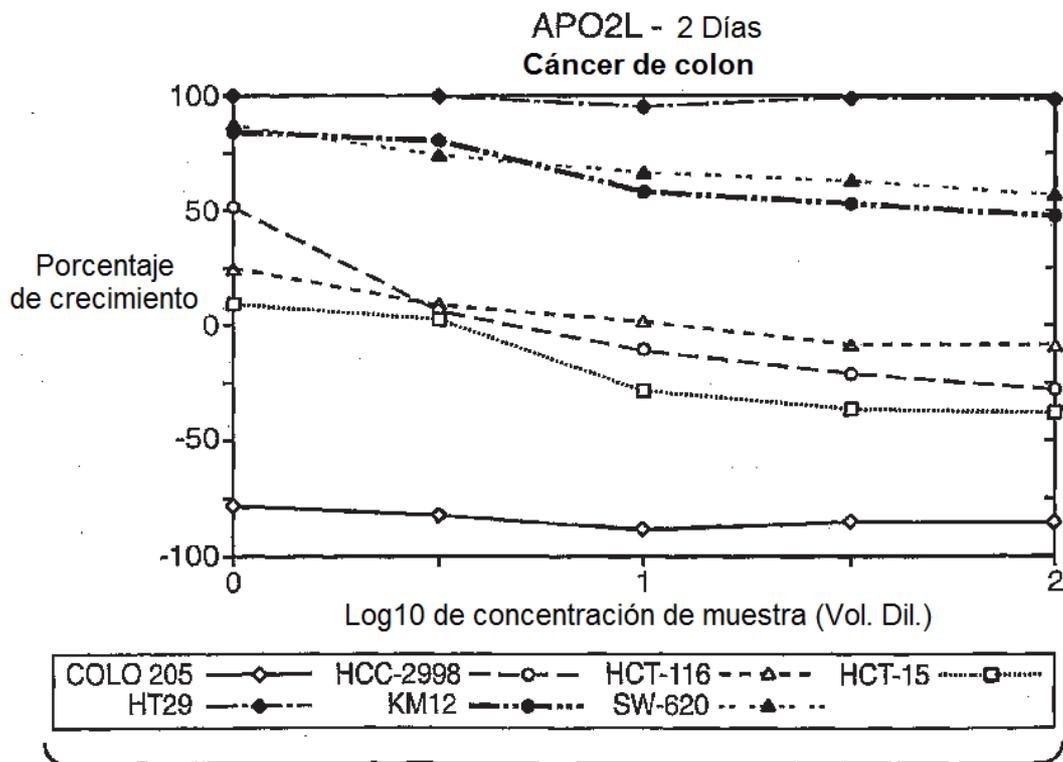
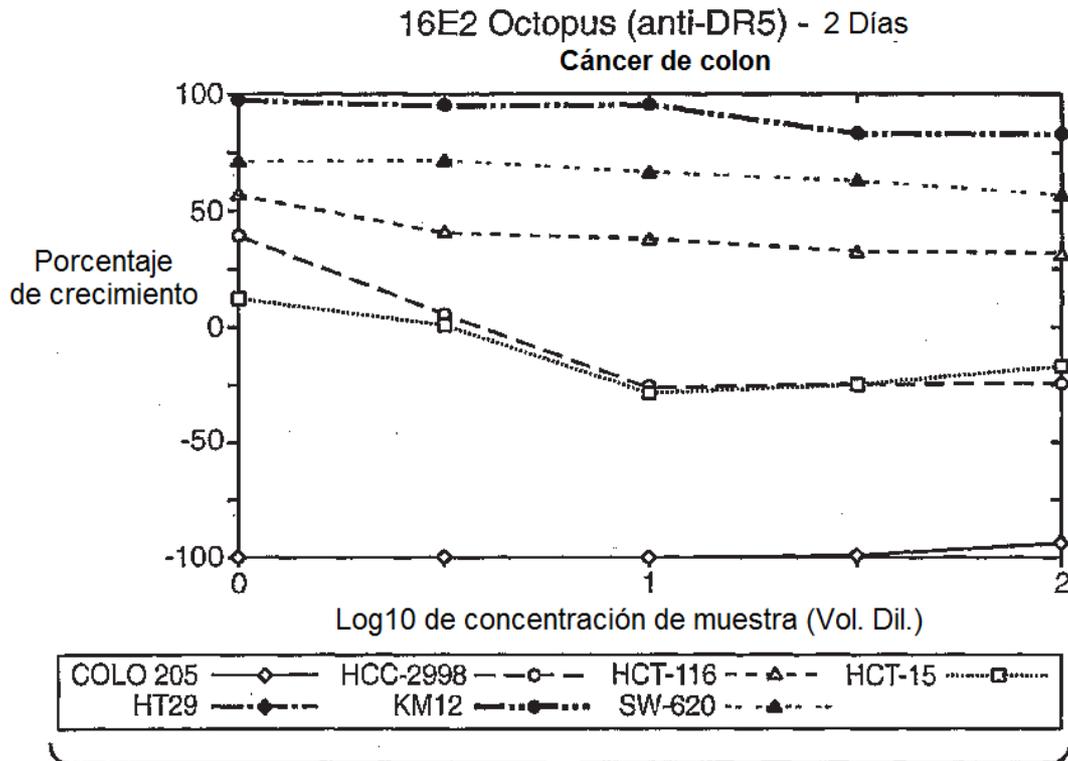
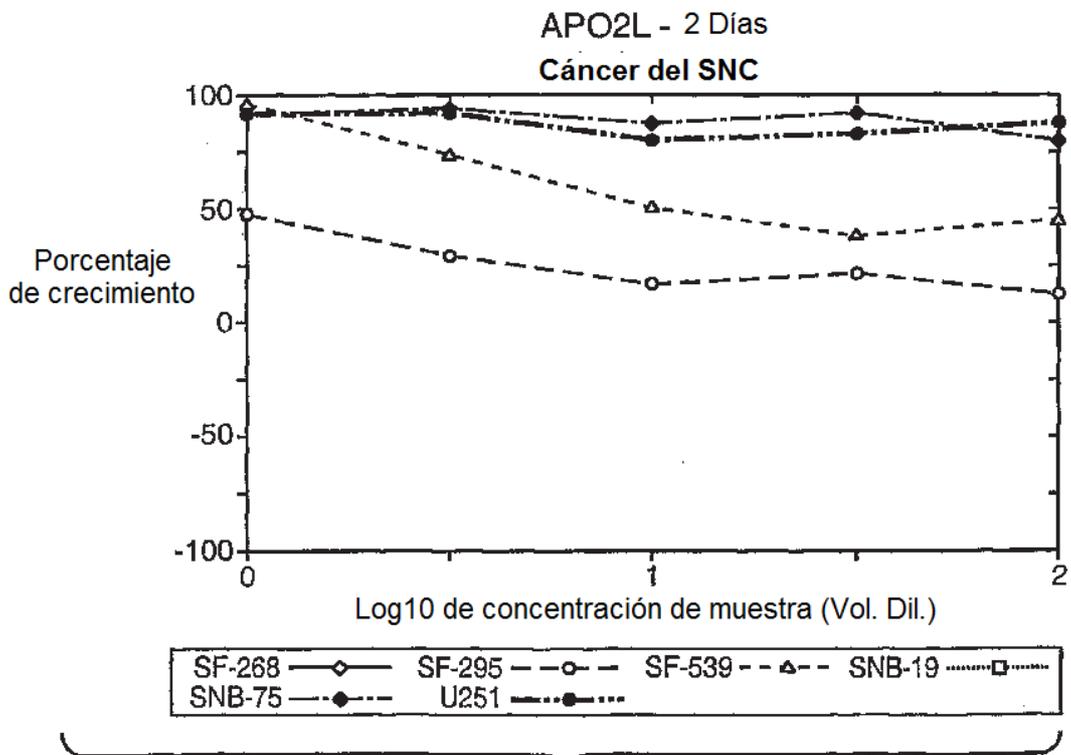
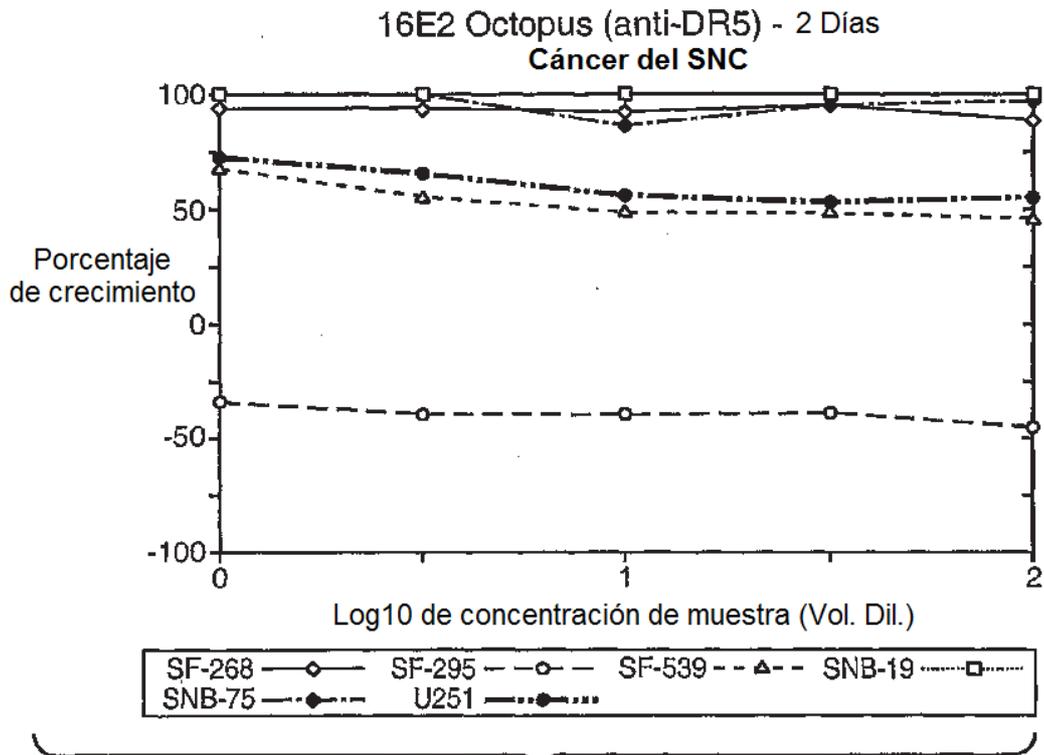
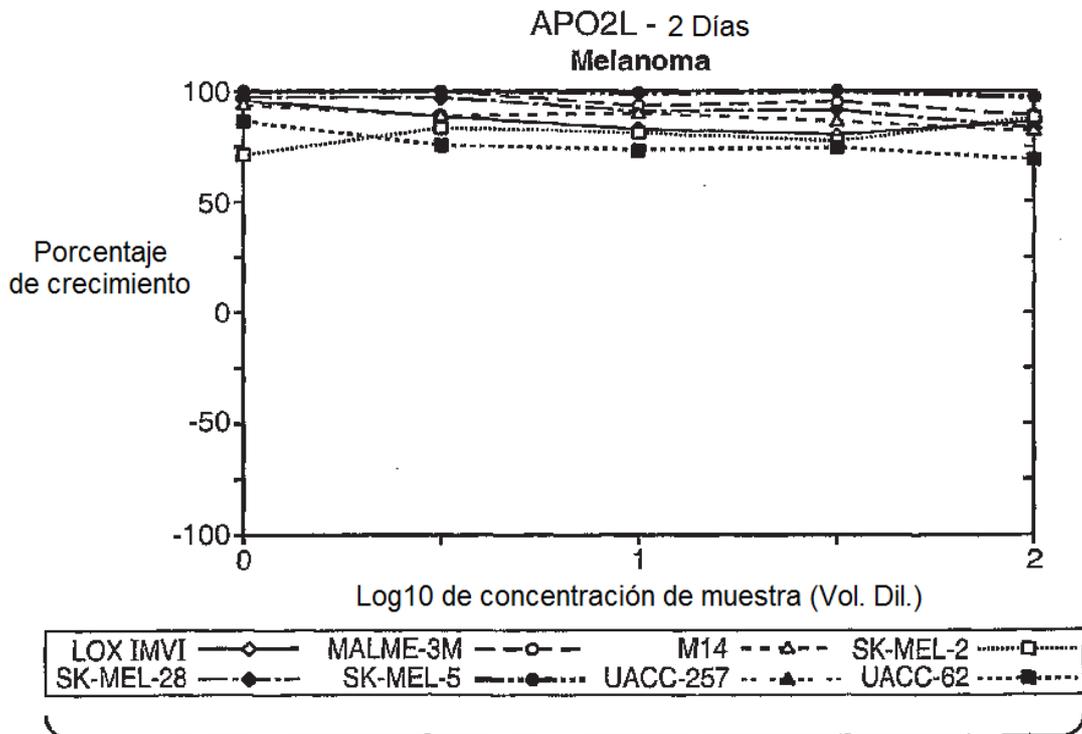
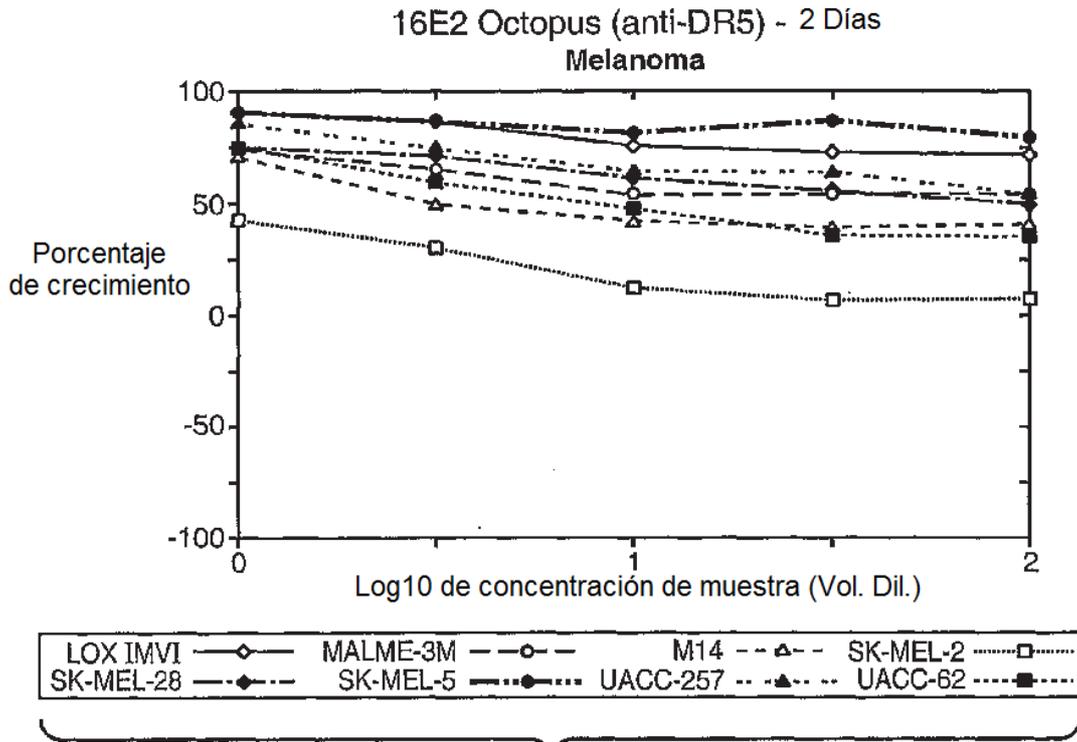


FIG. 18A-4







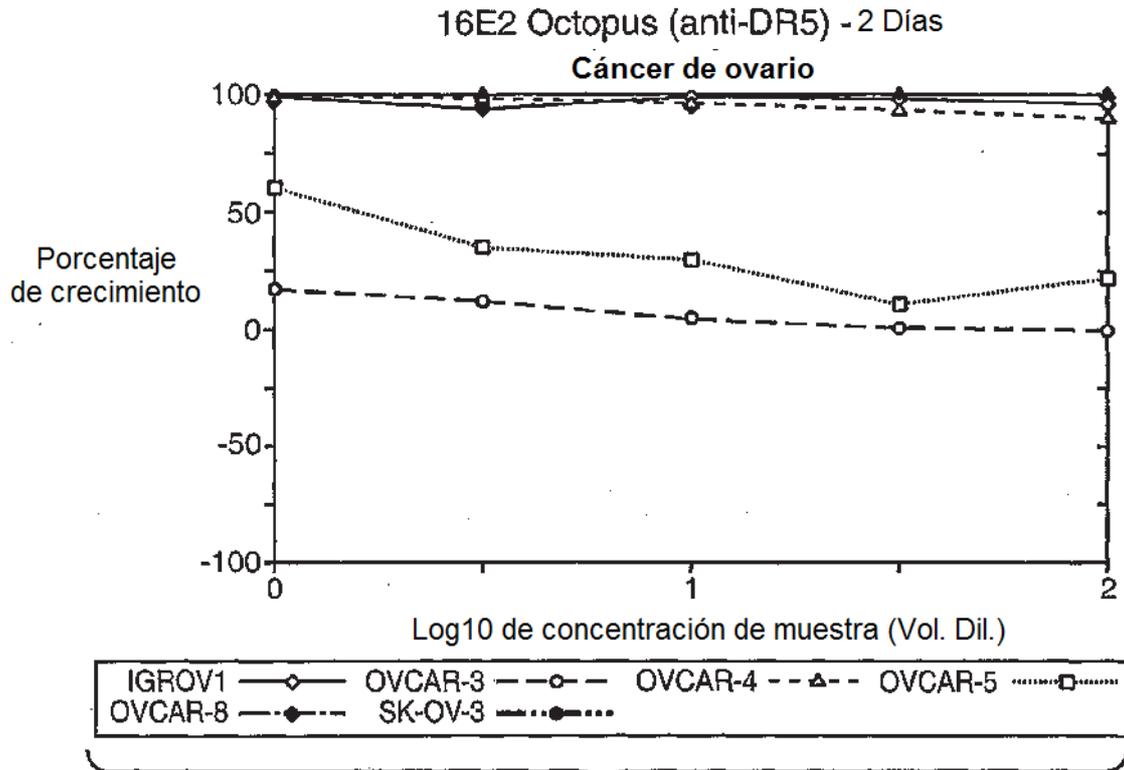


FIG. 18B-5

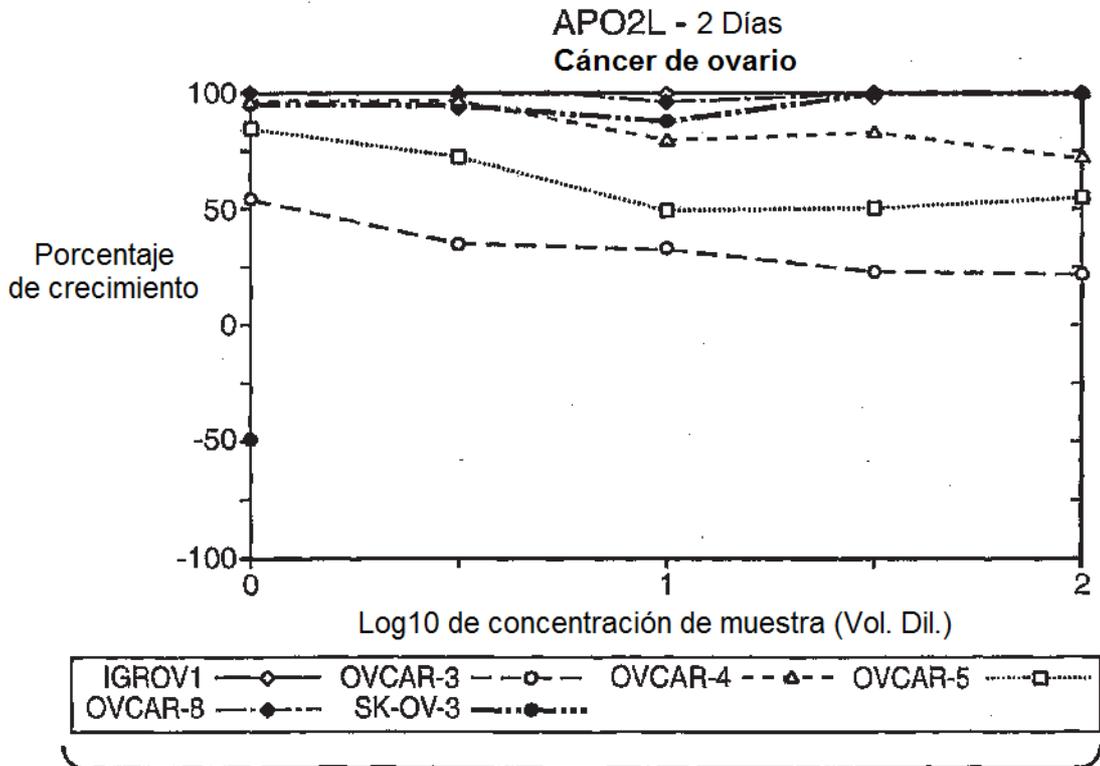


FIG. 18B-6

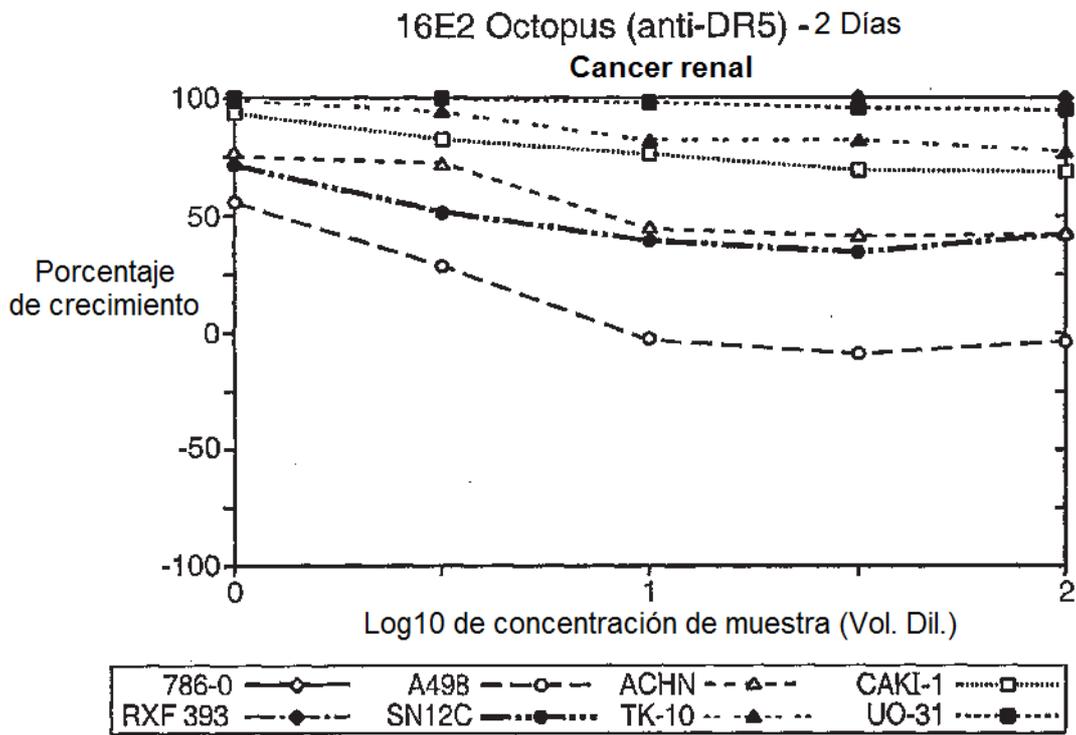


FIG. 18C-1

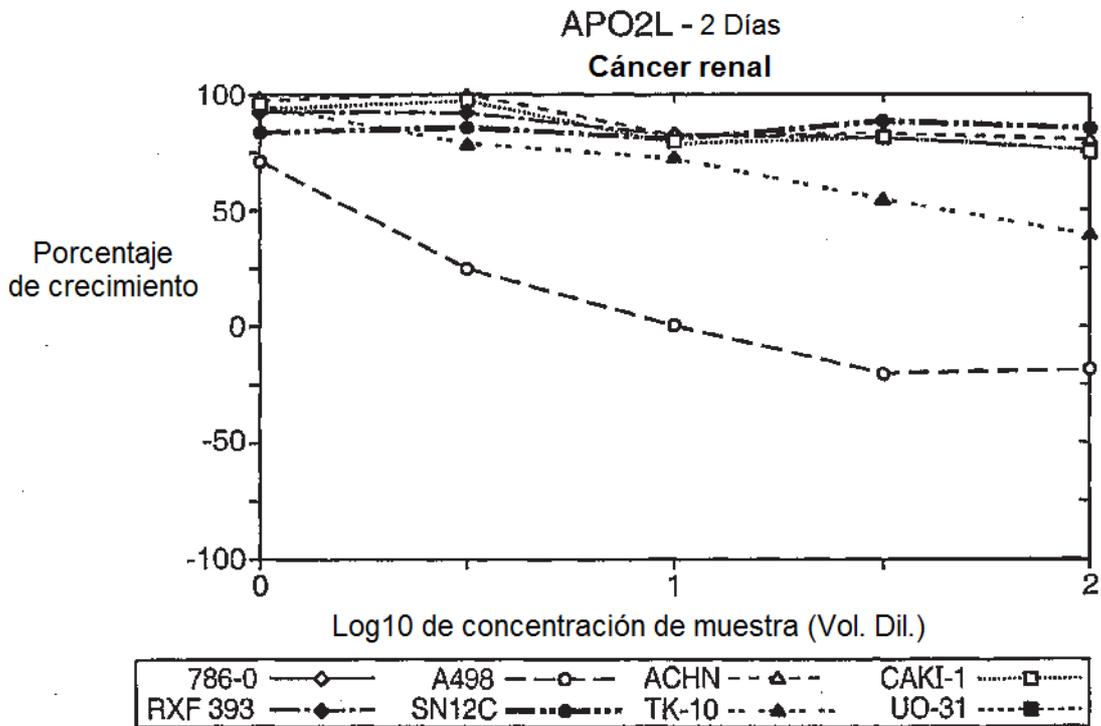


FIG. 18C-2

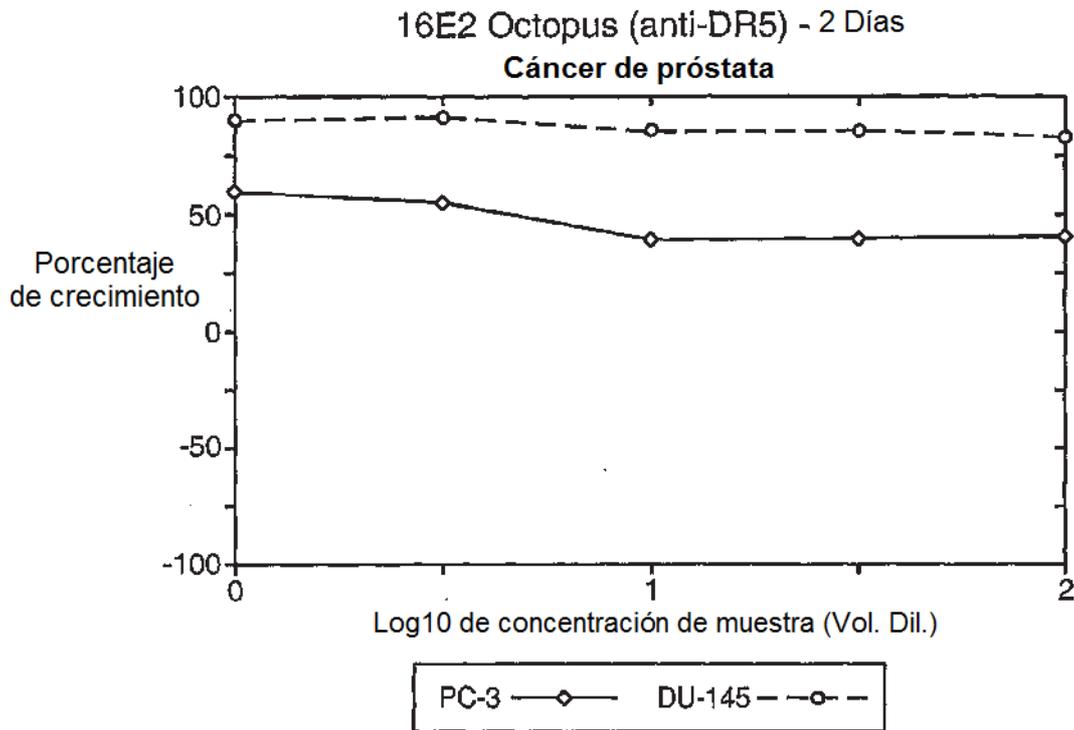


FIG. 18C-3

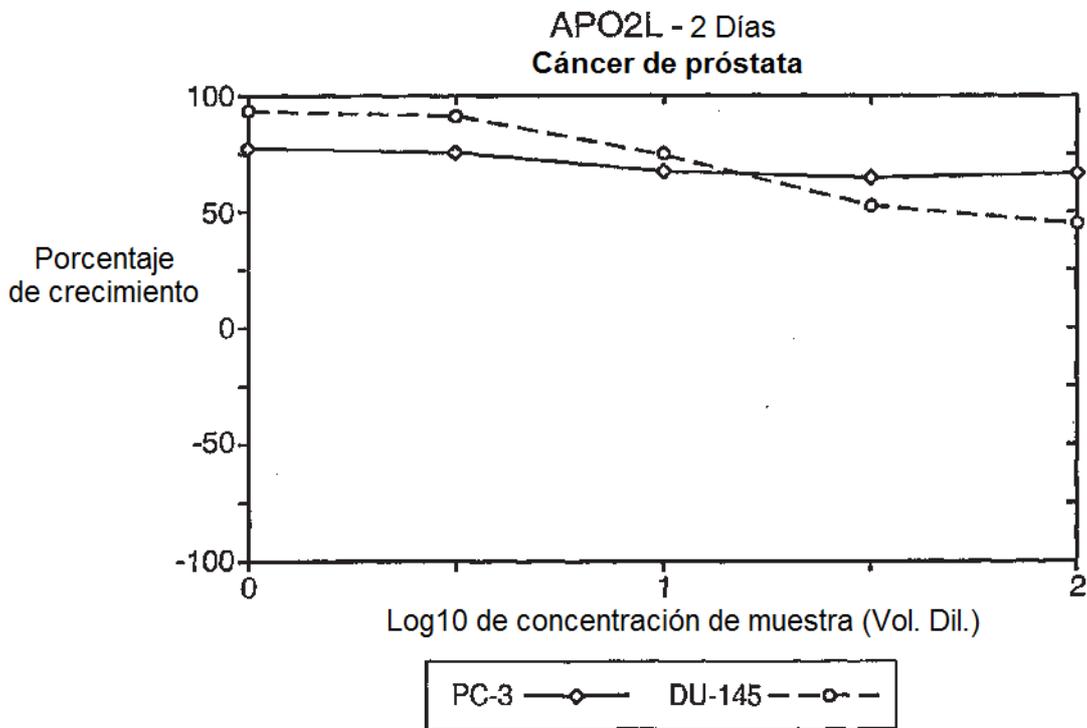
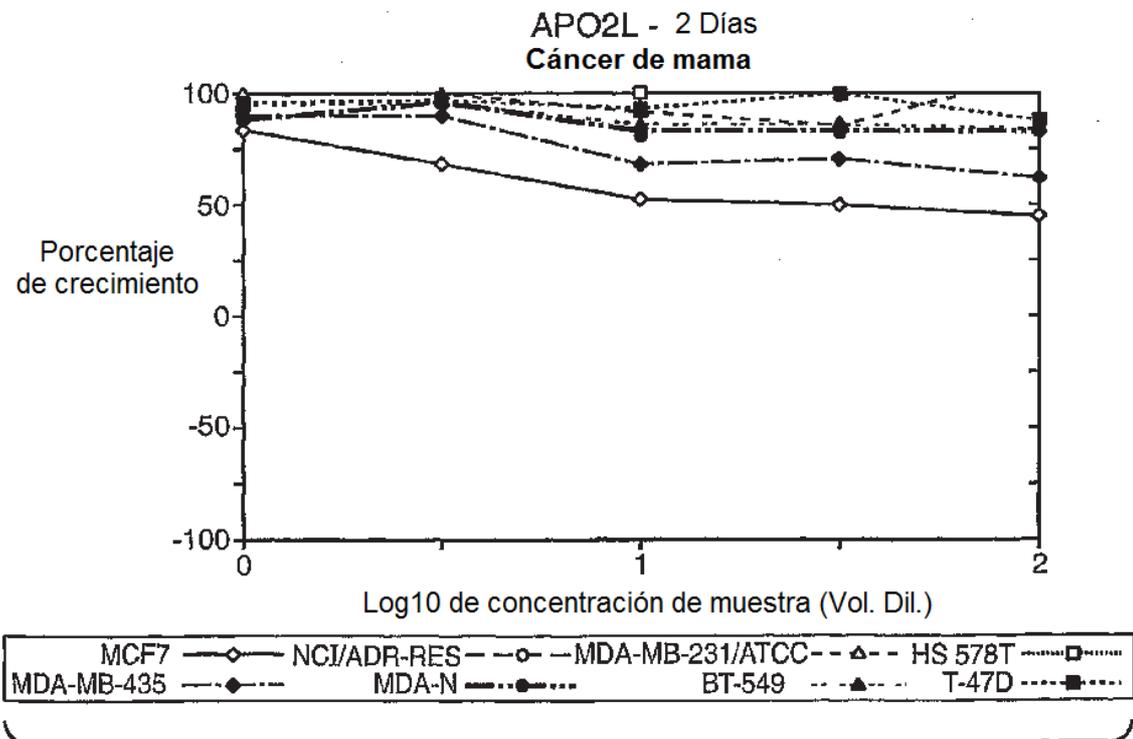
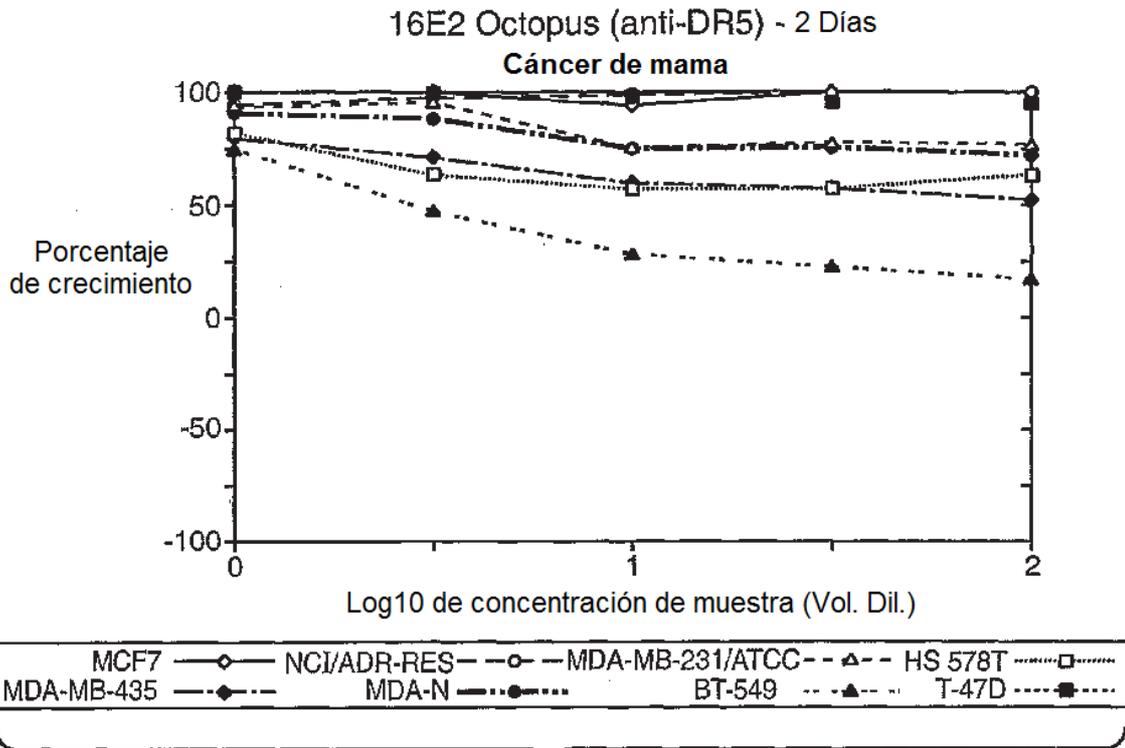
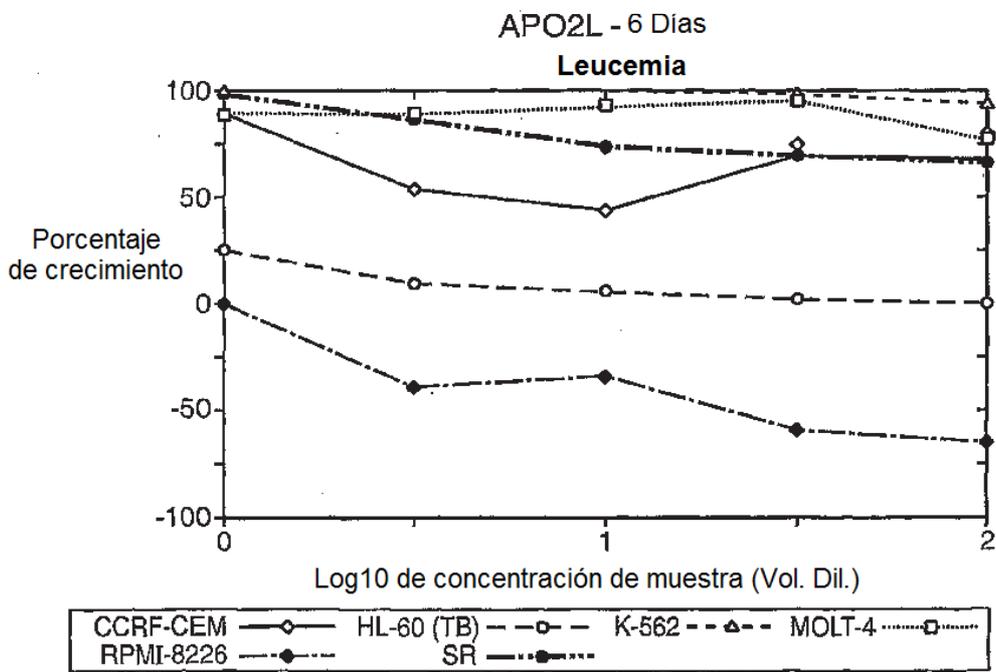
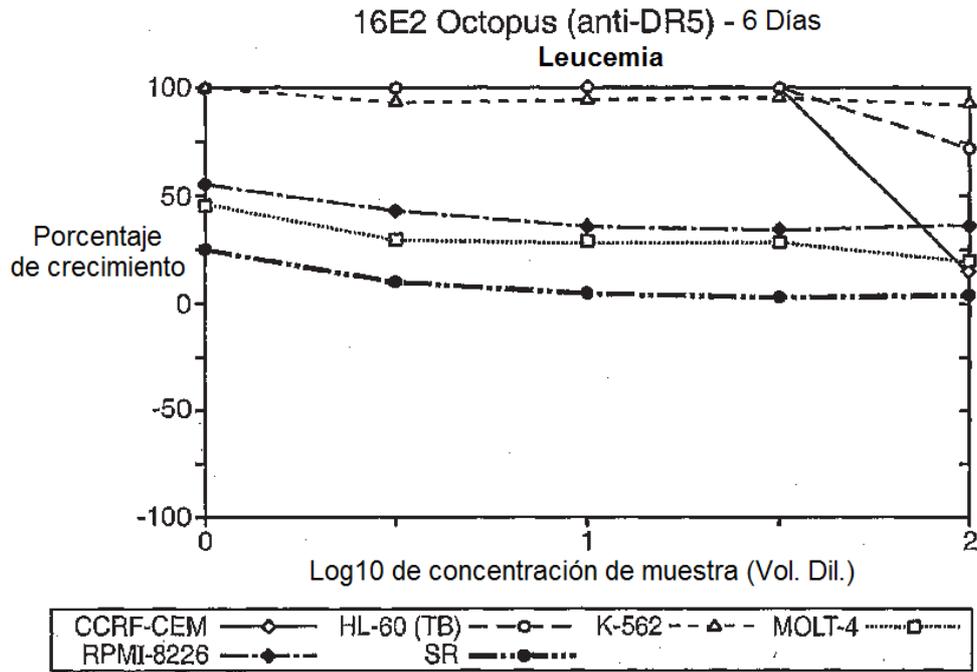


FIG. 18C-4





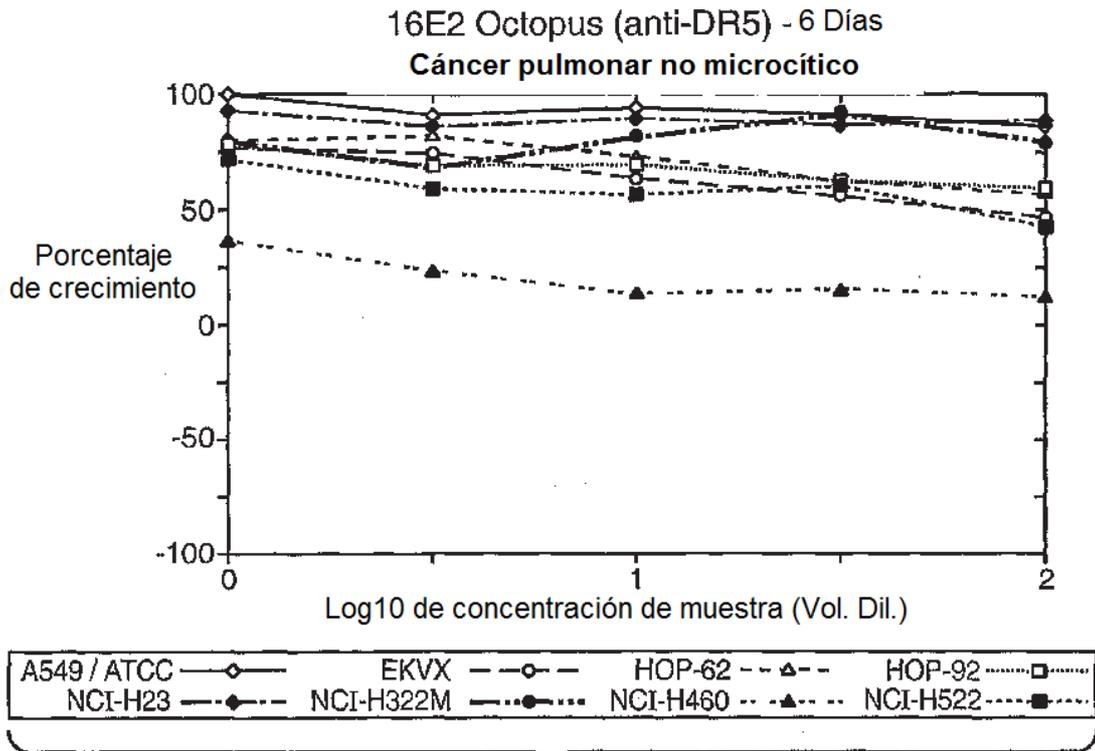


FIG. 19A-3

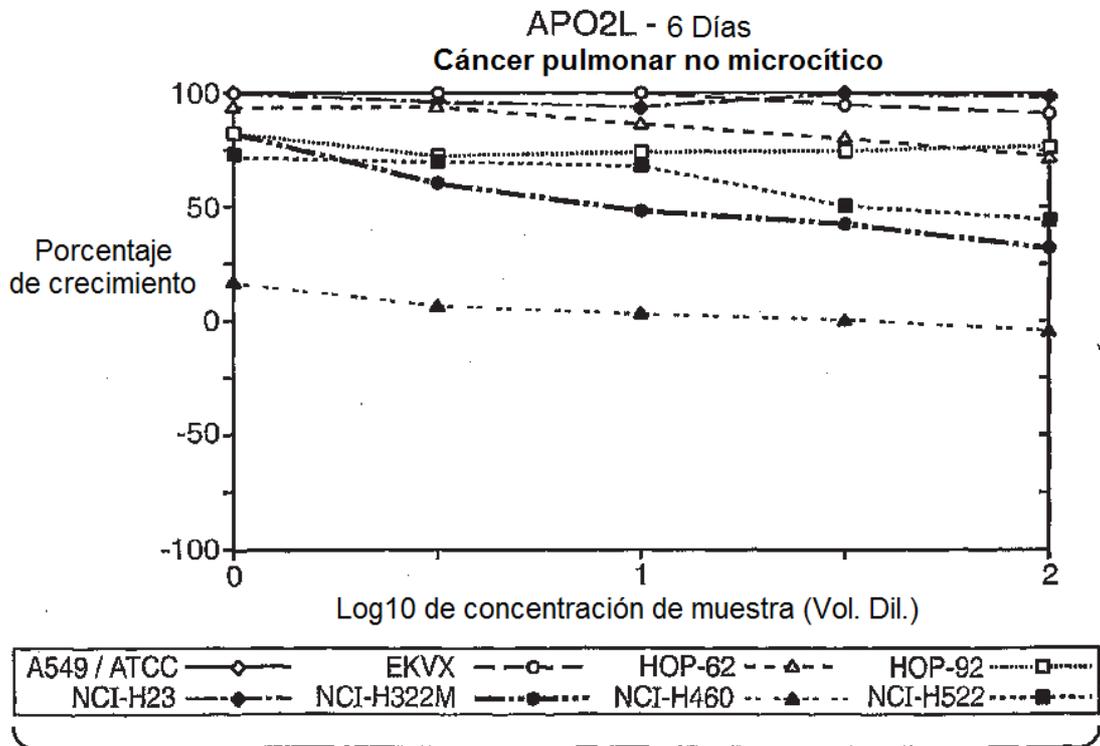
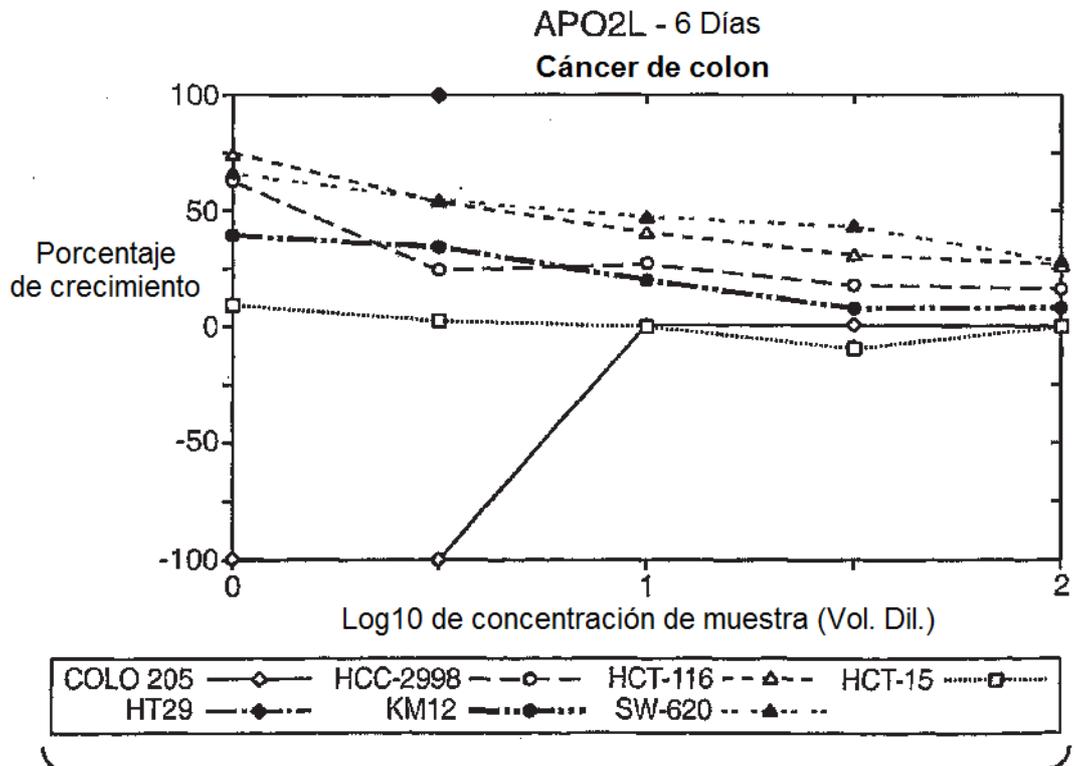
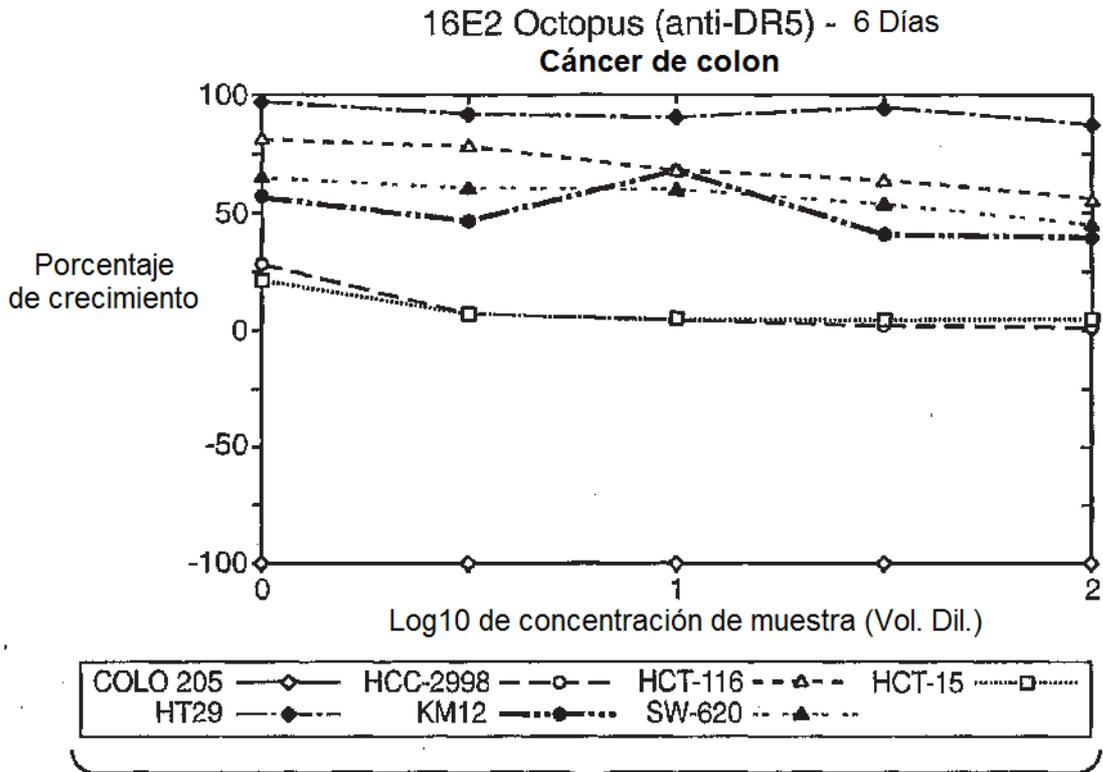
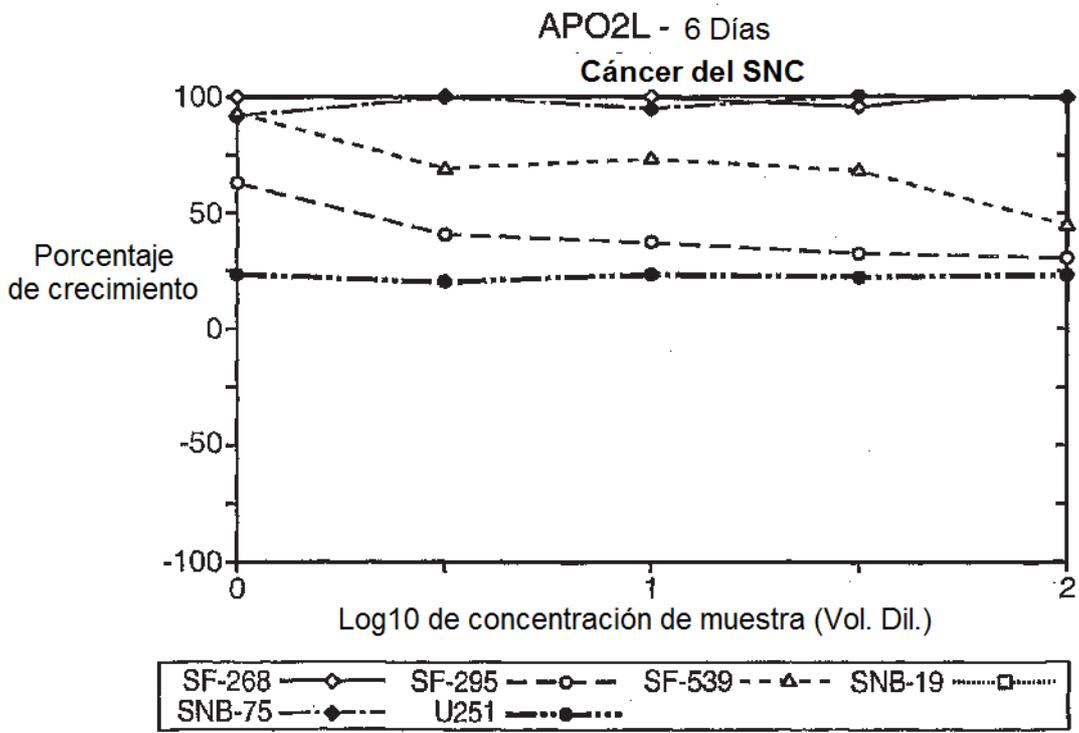
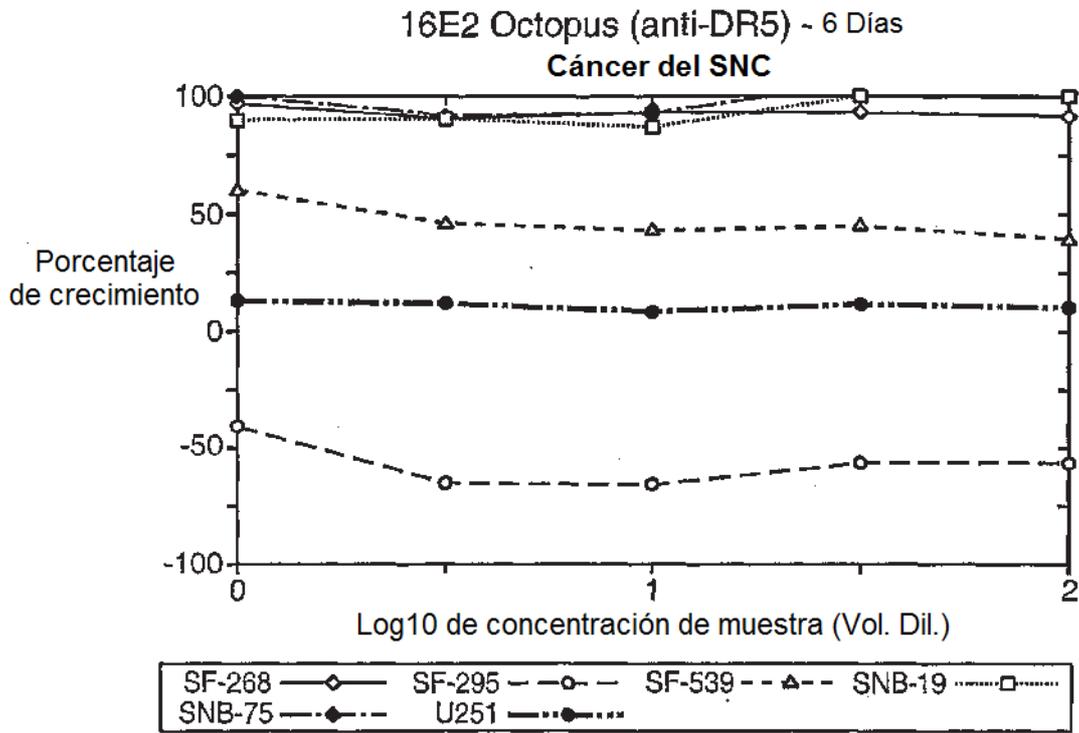
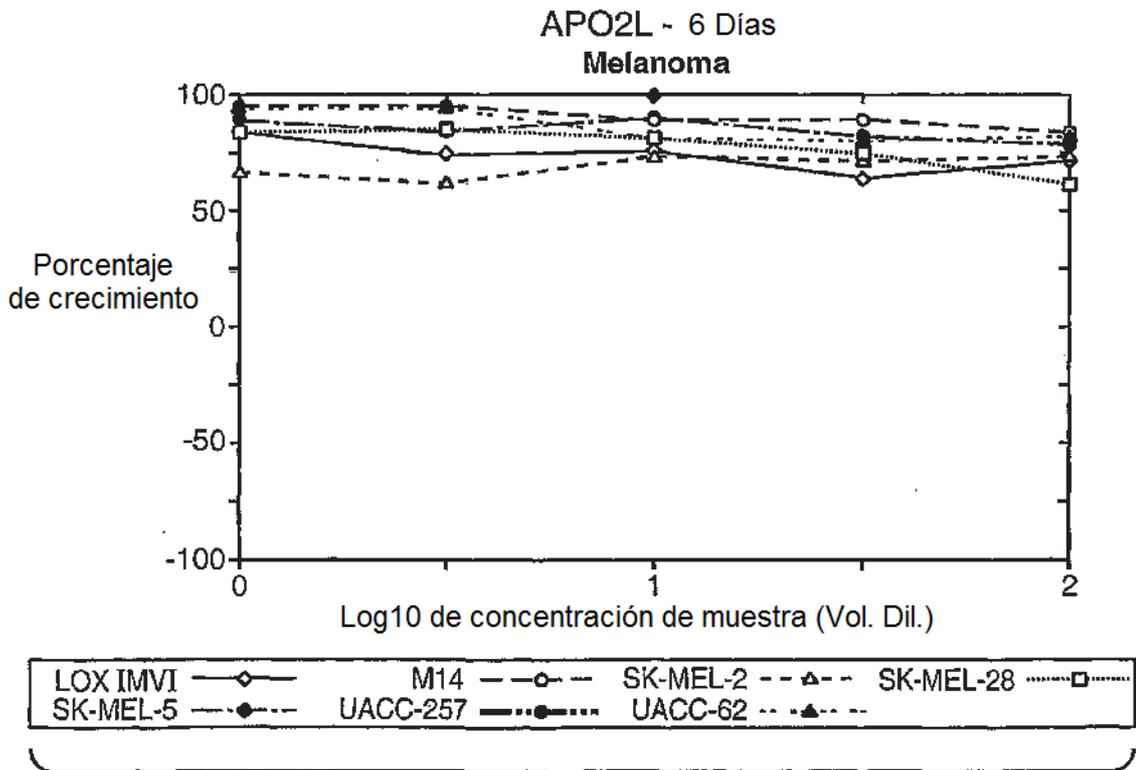
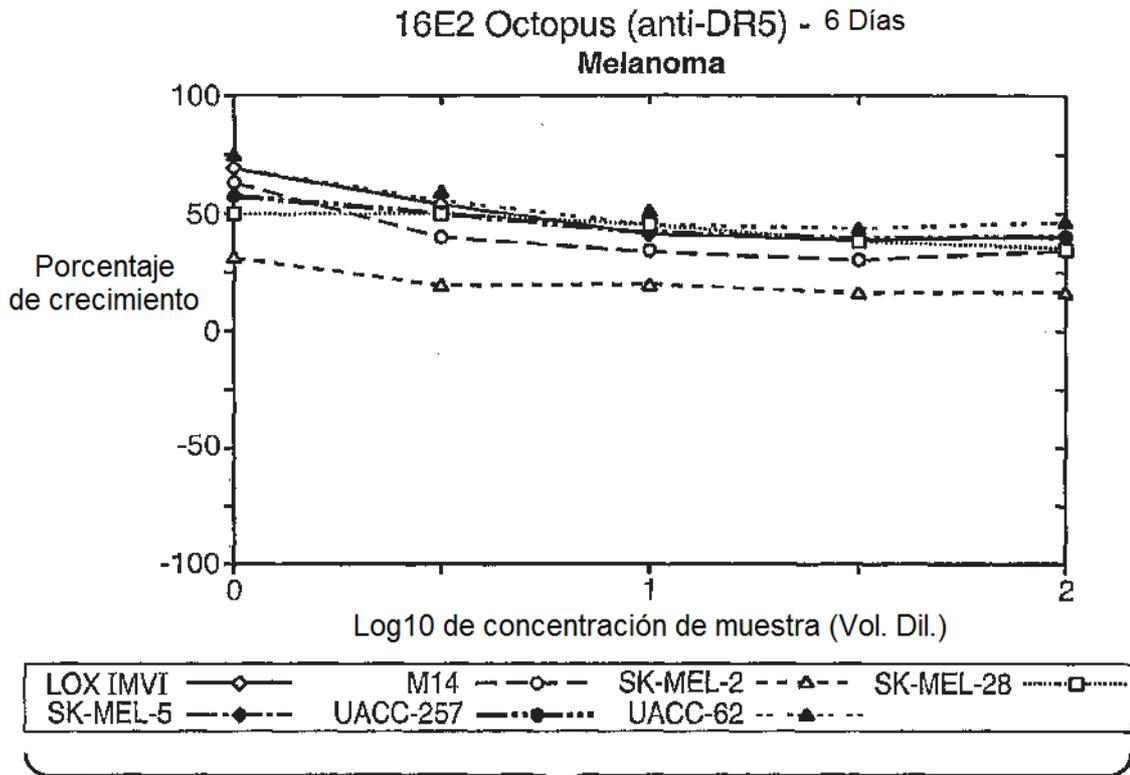
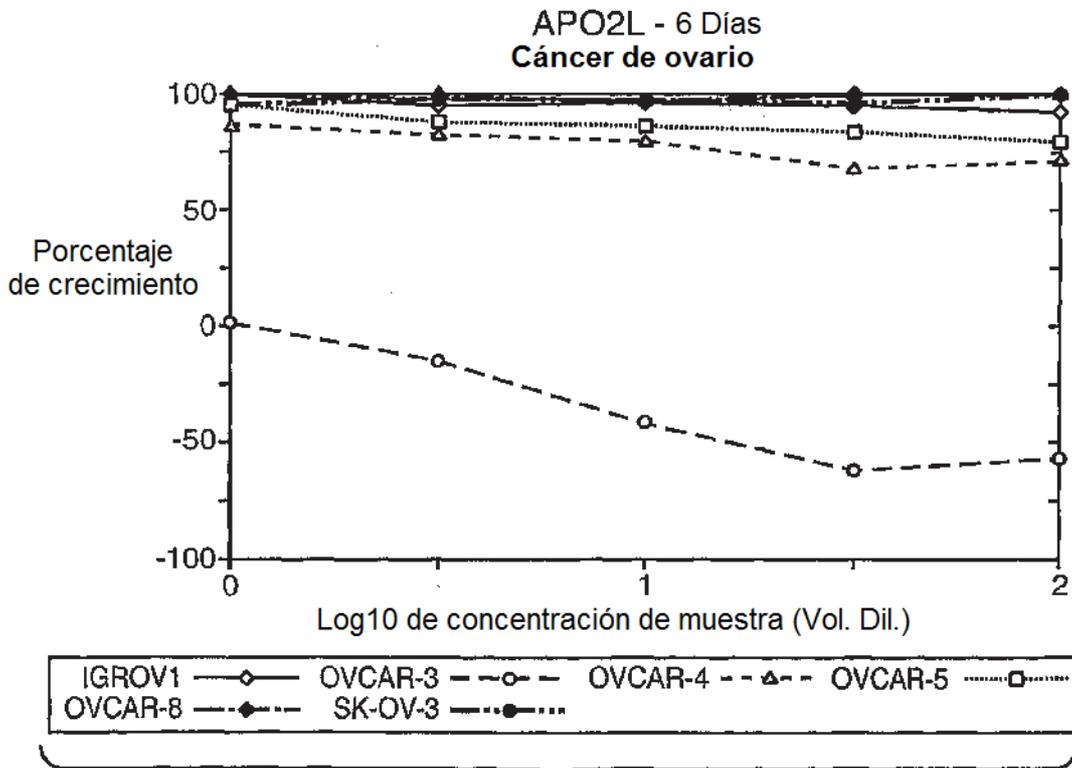
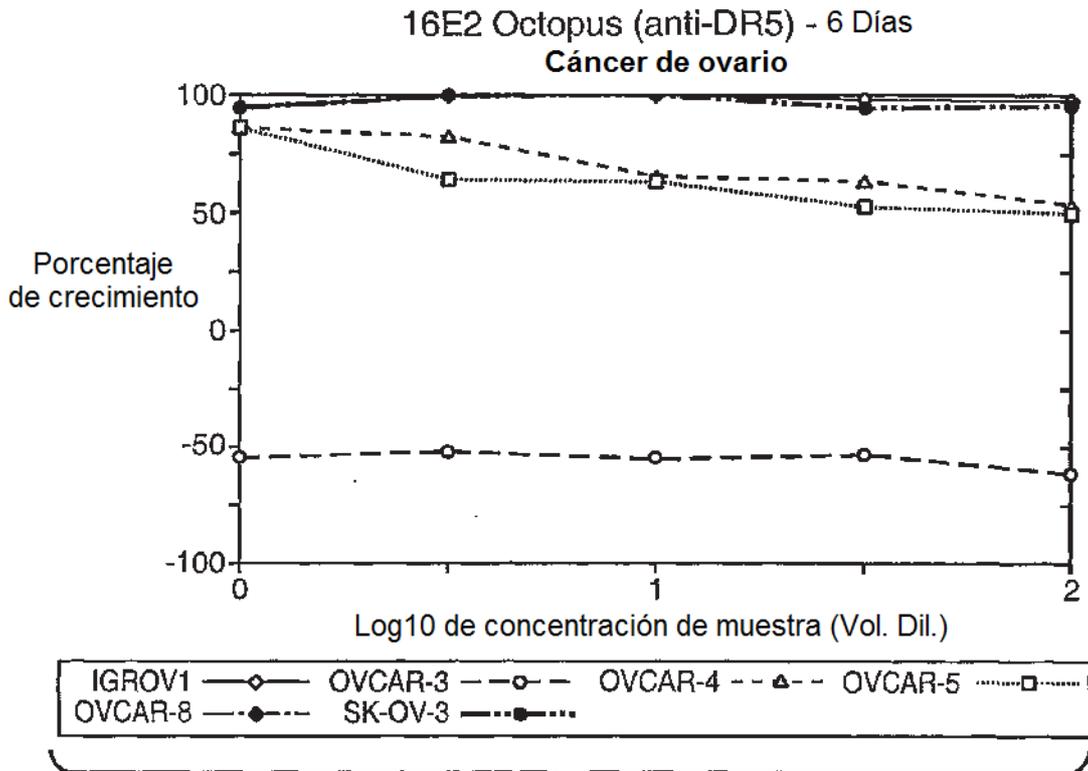


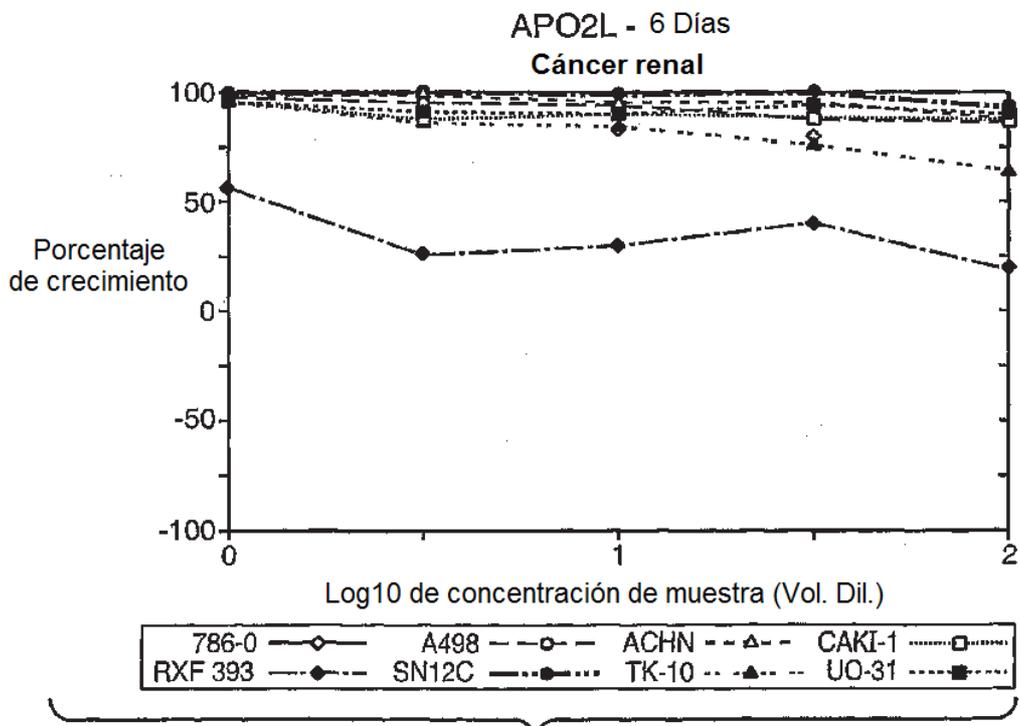
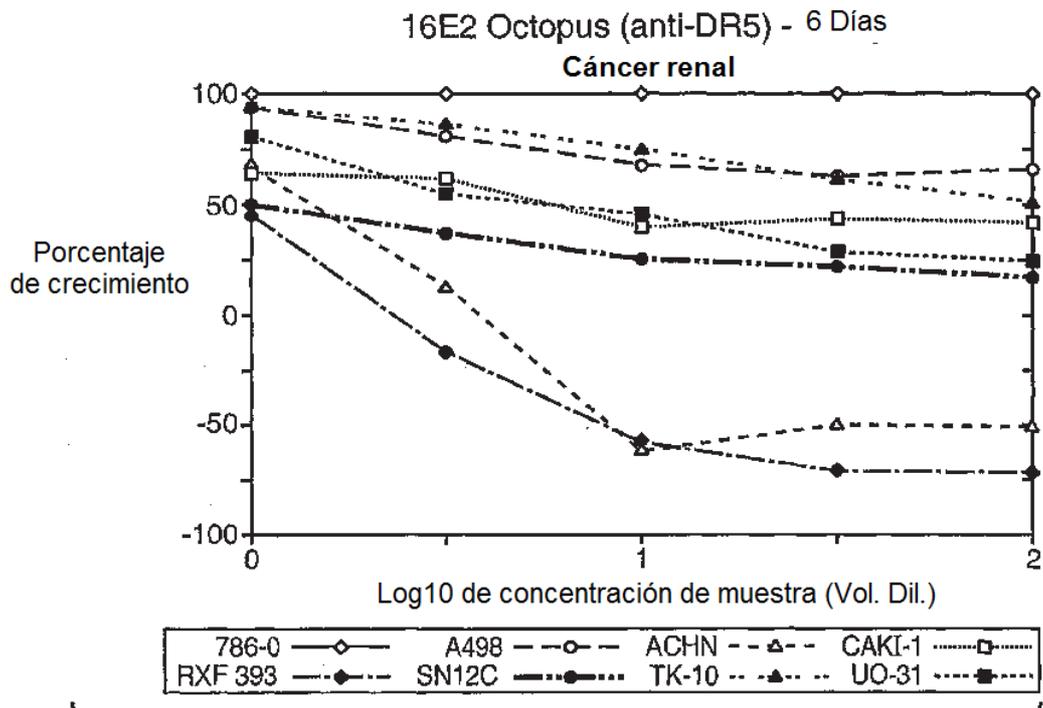
FIG. 19A-4

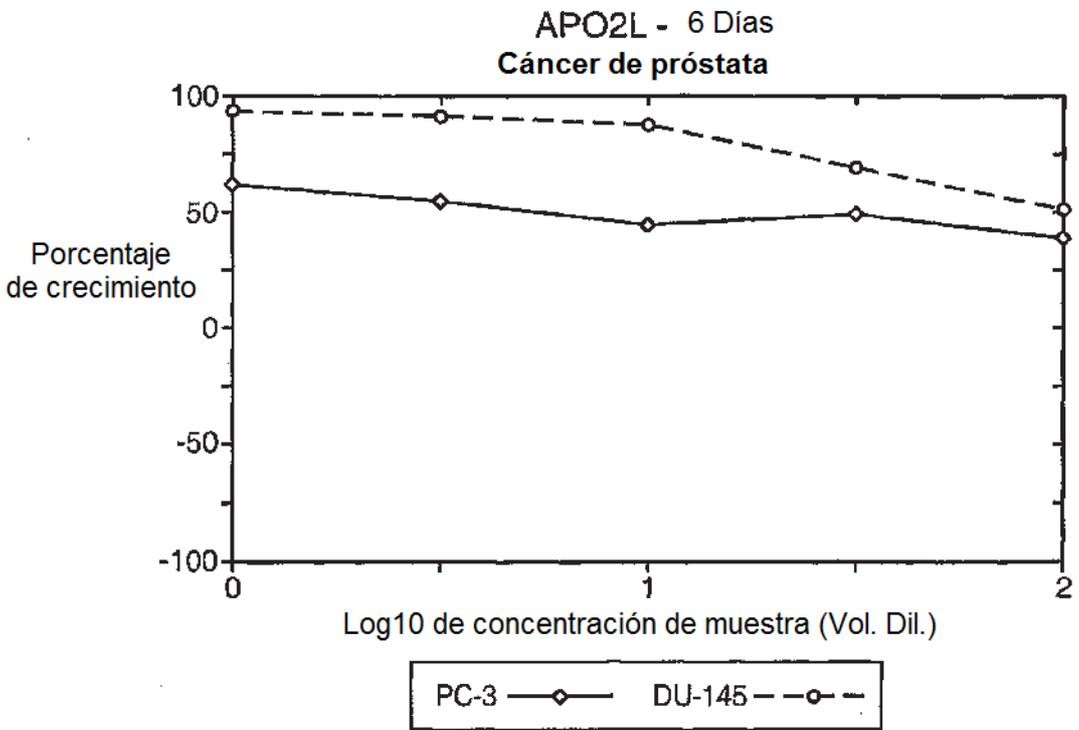
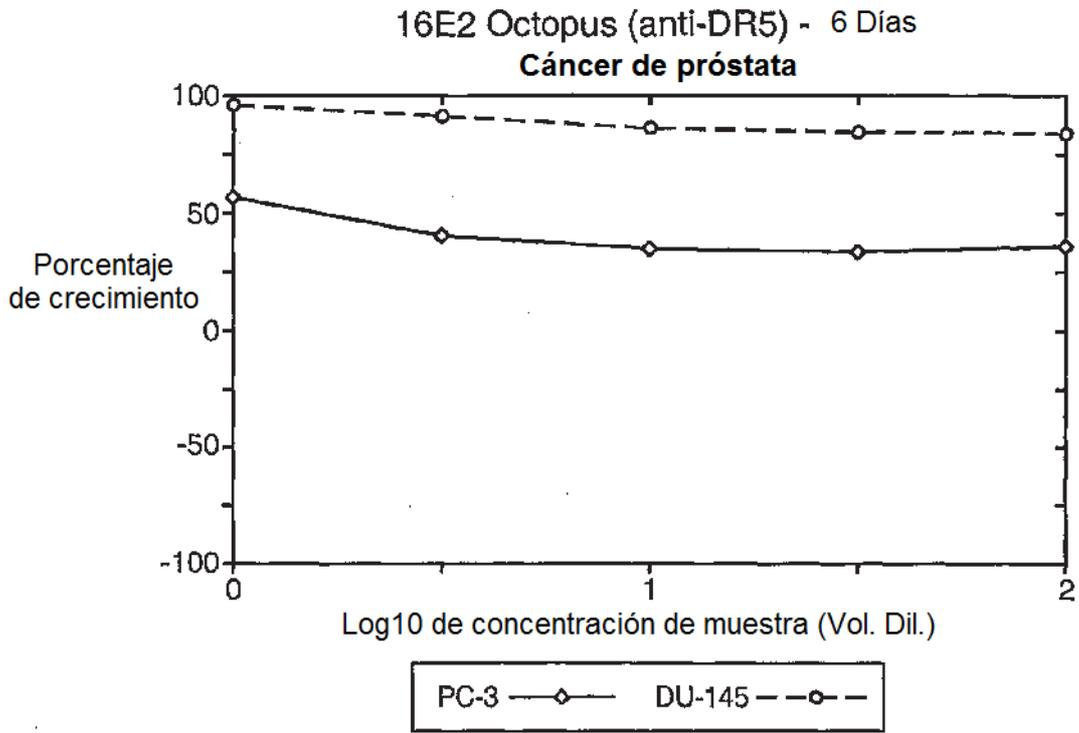












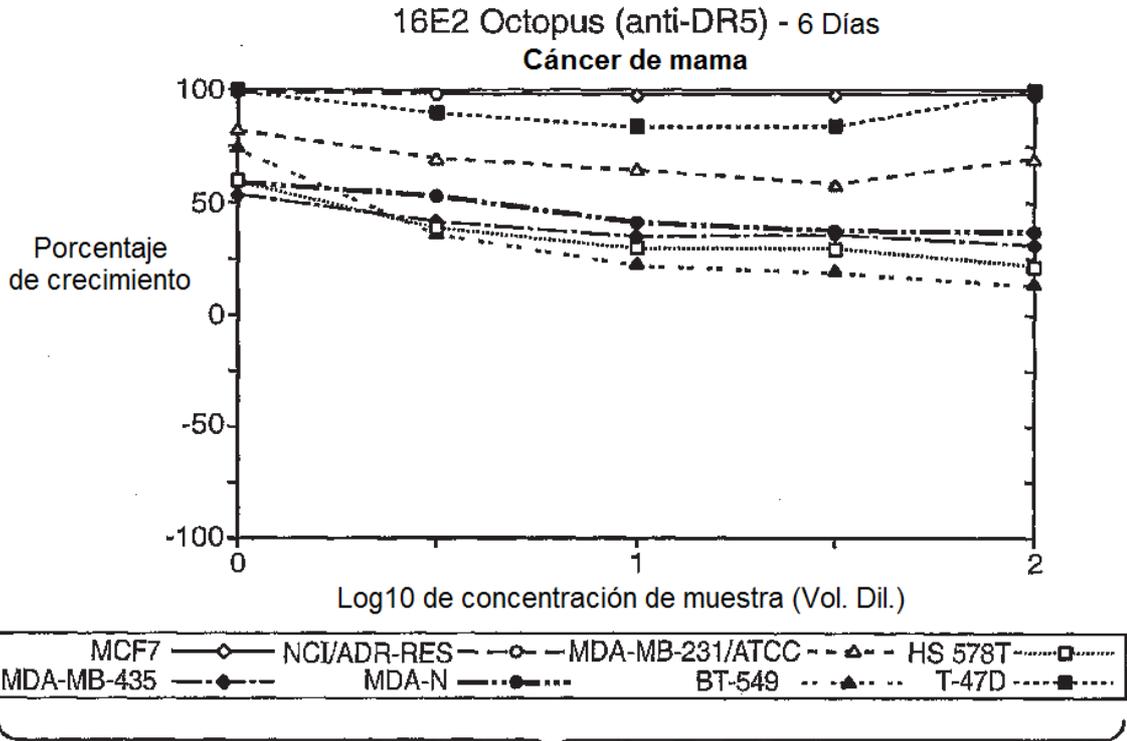


FIG. 19C-5

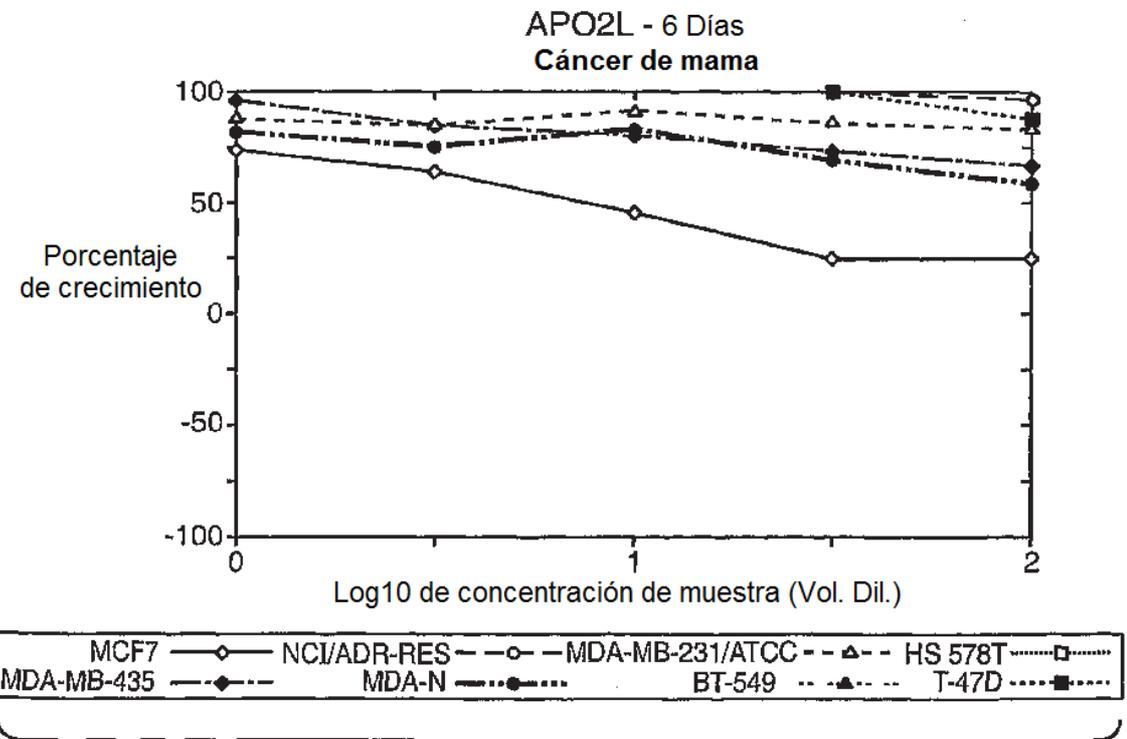


FIG. 19C-6

16E2 Octopus (anti-DR5)- 2 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | Densidades ópticas medias | | | | | |
|--------------------------------|-------------|---------------------|-------|---------------------------|--------|-------|-------|--|--|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | |
| Leucemia | | | | | | | | | |
| CCRF-CEM | 0,081 | 0,557 | 0,526 | 0,491 | 0,457 | 0,299 | 0,125 | | |
| HL-60(TB) | 0,487 | 1,935 | 1,821 | 1,827 | 1,486 | 0,843 | 0,561 | | |
| K-562 | 0,238 | 1,548 | 1,548 | 1,525 | 1,473 | 1,494 | 1,458 | | |
| MOLT-4 | 0,215 | 1,046 | 0,976 | 0,908 | 0,890 | 0,888 | 0,874 | | |
| RPMI-8226 | 0,335 | 1,302 | 1,067 | 1,009 | 0,947 | 0,937 | 0,959 | | |
| SR | 0,279 | 1,868 | 0,965 | 0,807 | 0,681 | 0,600 | 0,537 | | |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 0,212 | 1,132 | 1,155 | 1,091 | 1,061 | 1,094 | 1,096 | | |
| EKVX | 0,561 | 1,345 | 1,247 | 1,256 | 1,237 | 1,142 | 1,181 | | |
| HOP-62 | 0,363 | 1,082 | 1,147 | 1,156 | 1,191 | 1,182 | 1,158 | | |
| HOP-92 | 0,630 | 0,958 | 0,717 | 0,617 | 0,541 | 0,551 | 0,564 | | |
| NCI-H226 | 0,269 | 0,702 | 0,660 | 0,588 | 0,531 | 0,541 | 0,539 | | |
| NCI-H23 | 0,602 | 1,657 | 1,581 | 1,525 | 1,463 | 1,512 | 1,540 | | |
| NCI-H322M | 0,488 | 1,222 | 1,222 | 1,265 | 1,256 | 1,276 | 0,211 | | |
| NCI-H460 | 0,362 | 1,677 | 0,416 | 0,305 | 0,244 | 0,256 | 0,237 | | |
| NCI-H522 | 0,374 | 0,954 | 0,868 | 0,830 | 0,804 | 0,828 | 0,839 | | |
| Cáncer de colon | | | | | | | | | |
| COLO 205 | 0,145 | 0,829 | 0,003 | -0,002 | -0,008 | 0,004 | 0,009 | | |
| HCC-2998 | 0,334 | 0,797 | 0,511 | 0,353 | 0,246 | 0,250 | 0,252 | | |
| HCT-116 | 0,385 | 2,058 | 1,341 | 1,051 | 1,008 | 0,926 | 0,904 | | |
| HCT-15 | 0,205 | 1,218 | 0,324 | 0,204 | 0,146 | 0,154 | 0,169 | | |
| HT29 | 0,322 | 1,464 | 1,547 | 1,523 | 1,566 | 1,553 | 1,485 | | |
| KM12 | 0,240 | 1,281 | 1,243 | 1,218 | 1,224 | 1,096 | 1,097 | | |
| SW-620 | 0,134 | 0,961 | 0,713 | 0,721 | 0,678 | 0,645 | 0,594 | | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | |
| SF-268 | 0,360 | 1,045 | 1,005 | 1,008 | 0,992 | 1,013 | 0,970 | | |
| SP-295 | 0,512 | 1,311 | 0,344 | 0,313 | 0,312 | 0,313 | 0,282 | | |
| SF-539 | 0,220 | 1,153 | 0,860 | 0,750 | 0,673 | 0,674 | 0,657 | | |

FIG._20A-1

16E2 Octopus (anti-DR5) - 2 Días

Concentración Log10

| Panel/Línea celular | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | GI50 | TGI | LC50 |
|--------------------------------|---------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 | | | |
| Leucemia | | | | | | | | | | |
| CCRF-CEM | 94 | 86 | 79 | 46 | 9 | | 2,74E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HL-60 (TB) | 92 | 93 | 69 | 25 | 5 | | 1,64E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| K-562 | 100 | 98 | 94 | 96 | 93 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| MOLT-4 | 92 | 83 | 81 | 81 | 79 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| RPMI-8226 | 76 | 70 | 63 | 62 | 65 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SR | 43 | 33 | 25 | 20 | 16 | | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 102 | 95 | 92 | 96 | 96 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| EKVX | 87 | 89 | 86 | 74 | 79 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HOP-62 | 109 | 110 | 115 | 114 | 111 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HOP-92 | 26 | -2 | -14 | -13 | -10 | | <1,00E+00 | 2,92E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H226 | 90 | 74 | 61 | 63 | 62 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H23 | 93 | 88 | 82 | 86 | 89 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H322M | 94 | 100 | 99 | 101 | 93 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H460 | 4 | -16 | -33 | -29 | -35 | | <1,00E+00 | 1,27E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H522 | 85 | 79 | 74 | 78 | 80 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer de colon | | | | | | | | | | |
| COLO 205 | -98 | -100 | -100 | -98 | -94 | | <1,00E+00 | <1,00E+00 | <1,00E+00 | <1,00E+00 |
| HCC-2998 | 38 | 4 | -26 | -25 | -25 | | <1,00E+00 | 3,70E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HCT-116 | 57 | 40 | 37 | 32 | 31 | | 1,61E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HCT-15 | 12 | 0 | -29 | -25 | -18 | | <1,00E+00 | 3,03E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HT29 | 107 | 105 | 109 | 108 | 102 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| KML2 | 96 | 94 | 95 | 82 | 82 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SW-620 | 70 | 71 | 66 | 62 | 56 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | | |
| SF-268 | 94 | 94 | 92 | 95 | 89 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SF-295 | -33 | -39 | -39 | -39 | -45 | | <1,00E+00 | <1,00E+00 | <1,00E+00 | <1,00E+00 |
| SF-539 | 69 | 57 | 49 | 49 | 47 | | 8,14E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |

FIG._20A-2

16E2 Octopus (anti-DR5) - 2 Dias

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | | Densidades ópticas medias | | |
|---------------------|-------------|---------------------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| | | | | | | | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | |
| SNB-19 | 0,316 | 1,123 | 1,139 | 1,143 | 1,121 | 1,136 | 1,157 |
| SNB-75 | 0,326 | 0,637 | 0,651 | 0,640 | 0,596 | 0,623 | 0,628 |
| U251 | 0,197 | 0,981 | 0,766 | 0,718 | 0,642 | 0,620 | 0,636 |
| Melanoma | | | | | | | |
| LOX IMVI | 0,349 | 1,703 | 1,589 | 1,510 | 1,366 | 1,321 | 1,299 |
| MALME-3M | 0,350 | 0,732 | 0,643 | 0,600 | 0,555 | 0,557 | 0,553 |
| M1 4 | 0,320 | 1,246 | 0,982 | 0,783 | 0,716 | 0,689 | 0,703 |
| SK-MEL-2 | 0,592 | 0,982 | 0,758 | 0,712 | 0,639 | 0,618 | 0,622 |
| SK-MEL-28 | 0,345 | 1,033 | 0,853 | 0,835 | 0,768 | 0,729 | 0,668 |
| SK-MEL-5 | 0,346 | 2,111 | 1,937 | 1,893 | 1,770 | 1,869 | 1,721 |
| UACC-257 | 0,612 | 1,307 | 1,211 | 1,133 | 1,062 | 1,053 | 0,976 |
| UACC-62 | 0,597 | 1,806 | 1,509 | 1,318 | 1,166 | 1,038 | 1,024 |
| Cáncer de ovario | | | | | | | |
| IGROV1 | 0,209 | 0,934 | 0,927 | 0,876 | 0,915 | 0,905 | 0,893 |
| OVCAR-3 | 0,434 | 1,295 | 0,566 | 0,526 | 0,460 | 0,439 | 0,431 |
| OVCAR-4 | 0,359 | 1,495 | 1,464 | 1,453 | 1,442 | 1,404 | 1,361 |
| OVCAR-5 | 1,107 | 1,829 | 1,539 | 1,355 | 1,318 | 1,181 | 1,253 |
| OVCAR-8 | 0,238 | 0,890 | 0,903 | 0,875 | 0,881 | 0,923 | 0,882 |
| SK-OV-3 | 0,450 | 1,051 | 1,051 | 1,061 | 1,034 | 1,068 | 1,075 |
| Cáncer renal | | | | | | | |
| 786-0 | 0,453 | 1,495 | 1,504 | 1,506 | 1,492 | 1,491 | 1,512 |
| A498 | 0,757 | 1,482 | 1,150 | 0,968 | 0,743 | 0,690 | 0,726 |
| ACHN | 0,360 | 1,644 | 1,336 | 1,290 | 0,931 | 0,904 | 0,899 |
| CAKI-1 | 0,292 | 1,410 | 1,326 | 1,213 | 1,151 | 1,071 | 1,062 |
| RXF 393 | 0,546 | 1,151 | 1,107 | 1,203 | 1,149 | 1,156 | 1,157 |
| SN12C | 0,511 | 1,145 | 0,962 | 0,839 | 0,755 | 0,730 | 0,788 |
| TK-10 | 0,539 | 1,127 | 1,116 | 1,095 | 1,021 | 1,028 | 0,999 |
| DO-31 | 0,580 | 1,330 | 1,391 | 1,351 | 1,319 | 1,301 | 1,294 |

FIG_20A-3

16E2 Octopus(anti-DR5) - 2 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | LC50 |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|---------------------|-----|-----------|-----------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | Concentración Log10 | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | GI50 | TGI |
| Cáncer del SNC | | | | | | | |
| SNB-19 | 102 | 102 | 100 | 102 | 104 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SNB-75 | 104 | 101 | 87 | 96 | 97 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| U251 | 73 | 66 | 57 | 54 | 56 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Melanoma | | | | | | | |
| LOX IMVI | 92 | 86 | 75 | 72 | 70 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| MALME-3M | 77 | 65 | 53 | 54 | 53 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| M14 | 72 | 50 | 43 | 40 | 41 | 3,16E+00 | >1,00E+02 |
| SK-MEL-2 | 43 | 31 | 12 | 7 | 8 | <1,00E+00 | >1,00E+02 |
| SK-MEL-28 | 74 | 71 | 61 | 56 | 47 | 6,76E+01 | >1,00E+02 |
| SK-MEL-5 | 90 | 88 | 81 | 86 | 78 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| UACC-257 | 86 | 75 | 65 | 63 | 52 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| UACC-62 | 75 | 60 | 47 | 36 | 35 | 7,66E+00 | >1,00E+02 |
| Cáncer de ovario | | | | | | | |
| IGROV1 | 99 | 92 | 97 | 96 | 94 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| OVCAR-3 | 15 | 11 | 3 | 1 | -1 | <1,00E+00 | 5,19E+01 |
| OVCAR-4 | 97 | 96 | 95 | 92 | 88 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| OVCAR-5 | 60 | 34 | 29 | 10 | 20 | 1,56E+00 | >1,00E+02 |
| OVCAR-8 | 102 | 98 | 99 | 105 | 99 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SK-OV-3 | 100 | 102 | 97 | 103 | 104 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer renal | | | | | | | |
| 786-0 | 101 | 101 | 100 | 100 | 102 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| A498 | 54 | 29 | -2 | -9 | -4 | 1,21E+00 | 9,33E+00 |
| ACHN | 76 | 72 | 44 | 42 | 42 | 7,98E+00 | >1,00E+02 |
| CAKI-1 | 92 | 82 | 77 | 70 | 69 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| RXF 393 | 93 | 109 | 100 | 101 | 101 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SN12C | 71 | 52 | 39 | 34 | 44 | 3,70E+00 | >1,00E+02 |
| TK-10 | 98 | 95 | 82 | 83 | 78 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| DO-31 | 108 | 103 | 99 | 96 | 95 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |

FIG._20A-4

16E2 Octopus (anti-DR5) - 2 días

| Panel/Línea celular | Tiempo cero | Concentración Log10 | | | | | | |
|---------------------|----------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | |
| Cáncer de próstata | | | | | | | | |
| PC-3 | 0,332 | 0,865 | 0,653 | 0,628 | 0,546 | 0,545 | 0,552 | |
| DU-145 | 0,336 | 1,268 | 1,174 | 1,189 | 1,130 | 1,125 | 1,112 | |
| Cáncer de mama | | | | | | | | |
| MCF7 | 0,361 | 1,913 | 1,881 | 1,935 | 1,827 | 1,950 | 2,020 | |
| NCI/ADR-RES | 0,331 | 0,988 | 0,958 | 0,976 | 0,977 | 0,992 | 0,996 | |
| MDA-MB-231/ATCC | 0,590 | 0,974 | 0,998 | 0,958 | 0,883 | 0,895 | 0,887 | |
| HS 578T | 0,579 | 1,268 | 1,146 | 1,028 | 0,976 | 0,977 | 1,018 | |
| MDA-MB-435 | 0,261 | 1,249 | 1,055 | 0,972 | 0,858 | 0,843 | 0,783 | |
| MDA-N | 0,217 | 0,971 | 0,910 | 0,895 | 0,782 | 0,795 | 0,766 | |
| BT-549 | 0,570 | 1,446 | 1,237 | 0,989 | 0,820 | 0,773 | 0,728 | |
| T-47D | 0,382 | 1,004 | 0,963 | 0,993 | 1,010 | 1,013 | 1,026 | |

FIG. _20A-5

16E2 Octopus (anti-DR5) - 2 días

Concentración Log10

| Panel/Línea celular | Porcentaje de crecimiento | | | | | GI50 | TGI | IC50 |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | | |
| Cáncer de próstata | | | | | | | | |
| PC-3 | 60 | 55 | 40 | 40 | 41 | 4,75E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| DU-145 | 90 | 91 | 85 | 85 | 83 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer de mama | | | | | | | | |
| MCF7 | 98 | 101 | 94 | 102 | 107 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI/ADR-RES | 95 | 98 | 98 | 101 | 101 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| MDA-MB-231/ATCC | 106 | 96 | 76 | 79 | 77 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HS 578T | 82 | 65 | 58 | 58 | 64 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| MDA-MB-435 | 80 | 72 | 60 | 59 | 53 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| MDA-N | 92 | 90 | 75 | 77 | 73 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| BT-549 | 76 | 48 | 29 | 23 | 18 | 2,90E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| T-47D | 93 | 98 | 101 | 101 | 103 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |

FIG._20A-6

APO2L - 2 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | | | Densidades ópticas medias | | |
|--------------------------------|-------------|---------------------|-------|-------|-------|---------------------------|-------|--|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | |
| Leucemia | | | | | | | | |
| CCRF-CEM | 0,081 | 0,576 | 0,400 | 0,510 | 0,443 | 0,447 | 0,476 | |
| HL-60 (TB) | 0,487 | 1,926 | 1,660 | 1,118 | 1,074 | 0,881 | 0,857 | |
| K-562 | 0,238 | 1,596 | 1,629 | 1,557 | 1,416 | 1,371 | 1,349 | |
| MOLT-4 | 0,215 | 1,126 | 1,132 | 1,131 | 1,136 | 1,136 | 1,167 | |
| RPMI-8226 | 0,335 | 1,284 | 0,599 | 0,427 | 0,348 | 0,359 | 0,345 | |
| SR | 0,279 | 1,820 | 1,578 | 1,475 | 1,417 | 1,428 | 1,460 | |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 0,212 | 1,164 | 1,177 | 1,173 | 1,086 | 1,052 | 1,068 | |
| EKVX | 0,561 | 1,328 | 1,325 | 1,337 | 1,228 | 1,275 | 1,266 | |
| HOP-62 | 0,363 | 1,260 | 1,241 | 1,174 | 1,106 | 1,202 | 1,136 | |
| HOP-92 | 0,630 | 1,002 | 0,843 | 0,788 | 0,755 | 0,753 | 0,766 | |
| NCI-H226 | 0,269 | 0,642 | 0,651 | 0,691 | 0,677 | 0,665 | 0,663 | |
| NCI-H23 | 0,602 | 1,620 | 1,597 | 1,636 | 1,626 | 1,641 | 1,670 | |
| NCI-H322M | 0,488 | 1,265 | 1,138 | 1,054 | 0,821 | 0,808 | 0,779 | |
| NCI-H460 | 0,362 | 1,562 | 0,342 | 0,228 | 0,171 | 0,140 | 0,124 | |
| NCI-H522 | 0,374 | 0,760 | 0,722 | 0,705 | 0,691 | 0,674 | 0,657 | |
| Cáncer de colon | | | | | | | | |
| COLO 205 | 0,145 | 0,814 | 0,029 | 0,025 | 0,015 | 0,021 | 0,021 | |
| HCC-2998 | 0,334 | 0,742 | 0,538 | 0,354 | 0,291 | 0,260 | 0,235 | |
| HCT-116 | 0,385 | 1,855 | 0,726 | 0,483 | 0,389 | 0,348 | 0,349 | |
| HCT-15 | 0,205 | 1,183 | 0,279 | 0,211 | 0,144 | 0,128 | 0,125 | |
| HT29 | 0,322 | 1,477 | 1,515 | 1,485 | 1,404 | 1,462 | 1,446 | |
| KM12 | 0,240 | 1,440 | 1,235 | 1,190 | 0,922 | 0,865 | 0,799 | |
| SW-620 | 0,134 | 0,962 | 0,849 | 0,744 | 0,674 | 0,632 | 0,607 | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | |
| SF-268 | 0,360 | 0,874 | 0,891 | 0,873 | 0,886 | 0,901 | 0,898 | |
| SF-295 | 0,512 | 1,273 | 0,862 | 0,728 | 0,636 | 0,670 | 0,603 | |
| SF-539 | 0,220 | 1,040 | 1,006 | 0,820 | 0,632 | 0,528 | 0,574 | |

FIG._20B-1

APO2L - 2 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | GI50 | TGI | IC50 |
|--------------------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | | |
| Leucemia | | | | | | | | |
| CCRF-CEM | 64 | 87 | 73 | 74 | 80 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HL-60 (TB) | 82 | 44 | 41 | 27 | 26 | 2,63E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| K-562 | 102 | 97 | 87 | 83 | 82 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| MOLT-4 | 101 | 101 | 101 | 101 | 104 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| RPMI-8226 | 28 | 10 | 1 | 2 | 1 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SR | 84 | 78 | 74 | 75 | 77 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 101 | 101 | 92 | 88 | 90 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| EKVX | 100 | 101 | 87 | 93 | 92 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HOP-62 | 98 | 90 | 83 | 94 | 86 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| HOP-92 | 57 | 43 | 33 | 33 | 37 | 1,77E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H226 | 102 | 113 | 109 | 106 | 106 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H23 | 98 | 102 | 101 | 102 | 105 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H322M | 84 | 73 | 43 | 41 | 37 | 7,61E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| NCI-H460 | -6 | -37 | -53 | -61 | -66 | <1,00E+00 | <1,00E+00 | 8,18E+00 |
| NCI-H522 | 90 | 86 | 82 | 78 | 73 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer de colon | | | | | | | | |
| COLO 205 | -80 | -83 | -90 | -86 | -86 | <1,00E+00 | <1,00E+00 | <1,00E+00 |
| HCC-2998 | 50 | 5 | -13 | -22 | -30 | <1,00E+00 | 4,34E+00 | >1,00E+02 |
| HCT-116 | 23 | 7 | 0 | -10 | -9 | <1,00E+00 | 1,03E+01 | >1,00E+02 |
| HCT-15 | 8 | 1 | -30 | -38 | -39 | <1,00E+00 | 3,24E+00 | >1,00E+02 |
| HT29 | 103 | 101 | 94 | 99 | 97 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| KM12 | 83 | 79 | 57 | 52 | 47 | 4,89E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SW-620 | 86 | 74 | 65 | 60 | 57 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | |
| SF-268 | 103 | 100 | 102 | 105 | 105 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SF-295 | 46 | 28 | 16 | 21 | 12 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SF-539 | 96 | 73 | 50 | 38 | 43 | 1,02E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |

FIG._20B-2

APO2L - 2 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | | Densidades ópticas medias | | | |
|---------------------|-------------|---------------------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|--|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | |
| SNB-19 | 0,316 | 1,144 | 1,164 | 1,172 | 1,151 | 1,194 | 1,191 | |
| SNB-75 | 0,326 | 0,663 | 0,623 | 0,637 | 0,618 | 0,634 | 0,589 | |
| U251 | 0,197 | 0,980 | 0,913 | 0,909 | 0,814 | 0,833 | 0,876 | |
| Melanoma | | | | | | | | |
| LOX IMVI | 0,349 | 1,657 | 1,606 | 1,494 | 1,415 | 1,380 | 1,464 | |
| MALME-3M | 0,350 | 0,690 | 0,710 | 0,701 | 0,663 | 0,671 | 0,647 | |
| M14 | 0,320 | 1,267 | 1,213 | 1,130 | 1,167 | 1,124 | 1,104 | |
| SK-MEL-2 | 0,592 | 1,003 | 0,879 | 0,929 | 0,920 | 0,905 | 0,954 | |
| SK-MEL-28 | 0,345 | 1,061 | 1,051 | 1,028 | 0,986 | 0,991 | 0,930 | |
| SK-MEL-5 | 0,346 | 2,127 | 2,076 | 2,082 | 2,081 | 2,217 | 2,042 | |
| UACC-257 | 0,612 | 1,245 | 1,289 | 1,256 | 1,199 | 1,189 | 1,113 | |
| UACC-62 | 0,597 | 2,056 | 1,844 | 1,677 | 1,650 | 1,675 | 1,582 | |
| Cáncer de ovario | | | | | | | | |
| IGROV1 | 0,209 | 0,916 | 0,947 | 0,982 | 0,912 | 0,960 | 0,973 | |
| OVCAR-3 | 0,434 | 1,456 | 0,983 | 0,787 | 0,765 | 0,658 | 0,651 | |
| OVCAR-4 | 0,359 | 1,518 | 1,472 | 1,477 | 1,274 | 1,310 | 1,180 | |
| OVCAR-5 | 1,107 | 1,815 | 1,700 | 1,618 | 1,446 | 1,452 | 1,493 | |
| OVCAR-8 | 0,238 | 0,927 | 0,928 | 0,938 | 0,896 | 0,930 | 0,950 | |
| SK-OV-3 | 0,450 | 1,167 | 1,126 | 1,123 | 1,077 | 1,162 | 1,175 | |
| Cáncer renal | | | | | | | | |
| 786-0 | 0,453 | 1,424 | 1,386 | 1,400 | 1,434 | 1,446 | 1,489 | |
| A498 | 0,757 | 1,493 | 1,293 | 0,950 | 0,768 | 0,606 | 0,616 | |
| ACHN | 0,360 | 1,548 | 1,526 | 1,590 | 1,327 | 1,363 | 1,318 | |
| CAKI-1 | 0,292 | 1,503 | 1,439 | 1,477 | 1,266 | 1,371 | 1,210 | |
| RXF 393 | 0,546 | 1,208 | 1,172 | 1,170 | 1,087 | 1,086 | 1,058 | |
| SN12C | 0,511 | 1,155 | 1,055 | 1,072 | 1,050 | 1,080 | 1,064 | |
| TK-10 | 0,539 | 1,080 | 1,060 | 0,975 | 0,939 | 0,839 | 0,756 | |
| DO-31 | 0,580 | 1,342 | 1,334 | 1,361 | 1,391 | 1,387 | 1,439 | |

FIG._20B-3

APO2L - 2 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | GI50 | TGI | LC50 |
|-------------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|------|
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | GI50 | | | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | |
| SWB-19 | 102 | 103 | 101 | 106 | 106 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SNB-75 | 88 | 92 | 87 | 91 | 78 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| U251 | 91 | 91 | 79 | 81 | 87 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Melanoma | | | | | | | | | |
| LOX IMVI | 96 | 88 | 81 | 79 | 85 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MALME-3M | 106 | 103 | 92 | 94 | 87 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| M14 | 94 | 85 | 89 | 85 | 83 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-MEL-2 | 70 | 82 | 80 | 76 | 88 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-MEL-28 | 99 | 95 | 89 | 90 | 82 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-MEL-5 | 97 | 98 | 97 | 105 | 95 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| UACC-257 | 107 | 102 | 93 | 91 | 79 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| UACC-62 | 85 | 74 | 72 | 74 | 68 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer de ovario | | | | | | | | | |
| IGROV1 | 104 | 109 | 99 | 106 | 108 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| OVCAR-3 | 54 | 34 | 32 | 22 | 21 | 1,25E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| OVCAR-4 | 96 | 96 | 79 | 82 | 71 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| OVCAR-5 | 84 | 72 | 48 | 49 | 54 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| OVCAR-8 | 100 | 102 | 95 | 100 | 103 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-OV-3 | 94 | 94 | 87 | 99 | 101 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer renal | | | | | | | | | |
| 786-0 | 96 | 98 | 101 | 102 | 107 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| A498 | 73 | 26 | 1 | -20 | -19 | 1,76E+00 | 1+09E+01 | >1,00E+02 | |
| ACHN | 98 | 104 | 81 | 84 | 81 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| CAKI-1 | 95 | 98 | 80 | 89 | 76 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| RXF 393 | 95 | 94 | 82 | 82 | 77 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SN12C | 85 | 87 | 84 | 88 | 86 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| TK-10 | 96 | 81 | 74 | 56 | 40 | 4,77E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| DO-31 | 99 | 102 | 106 | 106 | 113 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |

FIG._20B-4

| | | APO2L - 2 Días | | | | | |
|---------------------|--------|---------------------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|
| | | Concentración Log10 | | Densidades ópticas medias | | | |
| Panel/Línea celular | Tiempo | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| Cáncer de próstata | Cero | | | | | | |
| PC-3 | 0,332 | 0,886 | 0,758 | 0,746 | 0,700 | 0,684 | 0,692 |
| DU-145 | 0,336 | 1,314 | 1,249 | 1,215 | 1,052 | 0,842 | 0,766 |
| Cáncer de mama | | | | | | | |
| MCF7 | 0,361 | 2,217 | 1,918 | 1,618 | 1,333 | 1,279 | 1,180 |
| NCI/ADR-RES | 0,331 | 0,947 | 0,987 | 1,016 | 0,975 | 0,985 | 0,981 |
| MDA-MB-231/ATCC | 0,590 | 0,986 | 0,985 | 0,988 | 0,958 | 0,924 | 1,020 |
| HS 578T | 0,579 | 1,049 | 1,074 | 1,055 | 1,045 | 1,047 | 1,077 |
| MDA-MB-435 | 0,261 | 1,392 | 1,295 | 1,274 | 1,027 | 1,055 | 0,954 |
| MDA-N | 0,217 | 0,929 | 0,859 | 0,897 | 0,806 | 0,806 | 0,807 |
| BT-549 | 0,570 | 1,415 | 1,383 | 1,377 | 1,294 | 1,297 | 1,256 |
| T-47D | 0,382 | 1,044 | 1,014 | 1,025 | 1,000 | 1,054 | 0,955 |

FIG._20B-5

APO2L - 2 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | 2,0 | GI50 | TGI | LC50 |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | | | | |
| Cáncer de próstata | | | | | | | | | | |
| PC-3 | 77 | 75 | 66 | 64 | 65 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| DU-145 | 93 | 90 | 73 | 52 | 44 | | 4,07E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer de mama | | | | | | | | | | |
| MCF7 | 84 | 68 | 52 | 49 | 44 | | 2,57E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| NCI/ADR-RES | 106 | 111 | 104 | 106 | 105 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-MB-231/ATCC | 100 | 100 | 93 | 84 | 109 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HS 578T | 105 | 101 | 99 | 100 | 106 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-MB-435 | 91 | 90 | 68 | 70 | 61 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-N | 90 | 96 | 83 | 83 | 83 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| BT-549 | 96 | 96 | 86 | 86 | 81 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| T-47D | 95 | 97 | 93 | 101 | 87 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |

FIG._20B-6

16E2 Octopus (anti-DR5) - 6 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | Densidades ópticas medias | | | | | |
|--------------------------------|-------------|---------------------|--------|---------------------------|--------|--------|--------|--|--|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | |
| Leucemia | | | | | | | | | |
| CCRF-CEM | 0,004 | 0,731 | 0,832 | 0,730 | 0,789 | 0,720 | 0,103 | | |
| HL-60 (TB) | 0,068 | 2,840 | 2,914 | 2,950 | 2,924 | 2,813 | 2,039 | | |
| K-562 | 0,046 | 2,941 | 2,912 | 2,718 | 2,776 | 2,799 | 2,688 | | |
| MOLT-4 | 0,009 | 0,981 | 0,450 | 0,287 | 0,266 | 0,282 | 0,196 | | |
| RPMI-8226 | 0,061 | 1,637 | 0,904 | 0,725 | 0,604 | 0,584 | 0,618 | | |
| SR | 0,031 | 2,631 | 0,642 | 0,261 | 0,136 | 0,091 | 0,110 | | |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 0,021 | 2,721 | 2,734 | 2,443 | 2,524 | 2,458 | 2,314 | | |
| EKVX | 0,057 | 1,201 | 0,939 | 0,896 | 0,773 | 0,683 | 0,581 | | |
| HOP-62 | 0,059 | 0,922 | 0,750 | 0,767 | 0,683 | 0,595 | 0,541 | | |
| HOP-92 | 0,110 | 0,792 | 0,642 | 0,573 | 0,577 | 0,525 | 0,512 | | |
| NCI-H23 | 0,103 | 1,191 | 1,103 | 1,027 | 1,069 | 1,034 | 1,057 | | |
| NCI-H322M | 0,038 | 1,051 | 0,841 | 0,716 | 0,858 | 0,965 | 0,826 | | |
| NCI-H460 | 0,050 | 2,780 | 1,042 | 0,668 | 0,399 | 0,459 | 0,387 | | |
| NCI-H522 | 0,064 | 0,648 | 0,481 | 0,406 | 0,386 | 0,409 | 0,307 | | |
| Cáncer de colon | | | | | | | | | |
| COLO 205 | 0,001 | 1,430 | -0,014 | -0,033 | -0,014 | -0,014 | -0,013 | | |
| HCC-2998 | 0,031 | 0,974 | 0,296 | 0,096 | 0,067 | 0,047 | 0,036 | | |
| HCT-116 | 0,068 | 2,951 | 2,404 | 2,329 | 2,028 | 1,901 | 1,691 | | |
| HCT-15 | 0,020 | 2,056 | 0,435 | 0,168 | 0,100 | 0,096 | 0,107 | | |
| HT29 | 0,052 | 2,528 | 2,445 | 2,325 | 2,293 | 2,387 | 2,210 | | |
| KM12 | 0,010 | 0,708 | 0,390 | 0,334 | 0,486 | 0,290 | 0,283 | | |
| SW-620 | 0,010 | 2,141 | 1,392 | 1,302 | 1,282 | 1,145 | 0,966 | | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | |
| SF-268 | 0,041 | 1,069 | 1,017 | 0,969 | 0,993 | 0,980 | 0,958 | | |
| SF-295 | 0,054 | 1,614 | 0,031 | 0,019 | 0,018 | 0,023 | 0,023 | | |
| SF-539 | 0,030 | 1,468 | 0,875 | 0,672 | 0,624 | 0,646 | 0,572 | | |

FIG._21A-1

16E2 Octopus (anti-DR5) - 6 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | | | | | TGI | IC50 | |
|--------------------------------|---------------------------|------|------|------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | | | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | GI50 | | | | | | | |
| Leucemia | | | | | | | | | | | | | |
| CCR5-CEM | 114 | 100 | 108 | 98 | 14 | 6,11E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HL-60 (TB) | 103 | 104 | 103 | 99 | 71 | >1,00E+02 | |
| K-562 | 99 | 92 | 94 | 95 | 91 | >1,00E+02 | |
| MOLT-4 | 45 | 29 | 26 | 28 | 19 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| RPMI-8226 | 53 | 42 | 34 | 33 | 35 | 1,43E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SR | 24 | 9 | 4 | 2 | 3 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 100 | 90 | 93 | 90 | 85 | >1,00E+02 | |
| EKVX | 77 | 73 | 63 | 55 | 46 | 5,80E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HOP-62 | 80 | 82 | 72 | 62 | 56 | >1,00E+02 | |
| HOP-92 | 78 | 68 | 68 | 61 | 59 | >1,00E+02 | |
| NCI-H23 | 92 | 85 | 89 | 86 | 88 | >1,00E+02 | |
| NCI-H322M | 79 | 67 | 81 | 92 | 78 | >1,00E+02 | |
| NCI-H460 | 36 | 23 | 13 | 15 | 12 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| NCI-H522 | 71 | 59 | 55 | 59 | 42 | 5,77E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer de colon | | | | | | | | | | | | | |
| COLO 205 | -100 | -100 | -100 | -100 | -100 | <1,00E+00 | |
| HCC-2998 | 28 | 7 | 4 | 2 | 1 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HCT-116 | 81 | 78 | 68 | 64 | 56 | >1,00E+02 | |
| HCT-15 | 20 | 7 | 4 | 4 | 4 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HT29 | 97 | 92 | 91 | 94 | 87 | >1,00E+02 | |
| KM12 | 54 | 46 | 68 | 40 | 39 | >1,00E+02 | |
| SW-620 | 65 | 61 | 60 | 53 | 45 | 4,95E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | | | | | |
| SF-268 | 95 | 90 | 93 | 91 | 89 | >1,00E+02 | |
| SF-295 | -43 | -66 | -67 | -57 | -57 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SF-539 | 59 | 45 | 41 | 43 | 38 | 2,05E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |

FIG._21A-2

16E2 Octopus (anti-DR5) - 6 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | | Densidades ópticas medias | | |
|---------------------|-------------|---------------------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| Cáncer del SNC | | | | | | | |
| SNB-19 | 0,016 | 1,813 | 1,594 | 1,598 | 1,544 | 1,794 | 1,822 |
| SNB-75 | 0,063 | 0,524 | 0,534 | 0,477 | 0,485 | 0,541 | 0,530 |
| U251 | 0,012 | 1,561 | 0,188 | 0,163 | 0,116 | 0,166 | 0,147 |
| Melanoma | | | | | | | |
| LOX IMVI | 0,037 | 3,073 | 2,094 | 1,635 | 1,272 | 1,229 | 1,274 |
| M14 | 0,035 | 1,838 | 1,147 | 0,745 | 0,628 | 0,585 | 0,652 |
| SK-MEL-2 | 0,083 | 0,498 | 0,209 | 0,160 | 0,166 | 0,151 | 0,153 |
| SK-MEL-28 | 0,045 | 1,316 | 0,703 | 0,668 | 0,603 | 0,524 | 0,478 |
| SK-MEL-5 | 0,095 | 1,885 | 1,902 | 1,947 | 1,880 | 1,916 | 1,895 |
| UACC-257 | 0,070 | 0,841 | 0,504 | 0,447 | 0,420 | 0,393 | 0,376 |
| UACC-62 | 0,121 | 1,601 | 1,119 | 0,932 | 0,781 | 0,764 | 0,810 |
| Cáncer de ovario | | | | | | | |
| IGROV1 | 0,018 | 1,567 | 1,476 | 1,603 | 1,622 | 1,529 | 1,510 |
| OVCAR-3 | 0,086 | 1,285 | 0,039 | 0,041 | 0,039 | 0,040 | 0,033 |
| OVCAR-4 | 0,071 | 1,563 | 1,304 | 1,287 | 1,028 | 0,998 | 0,854 |
| OVCAR-5 | 0,101 | 1,606 | 1,390 | 1,053 | 1,046 | 0,873 | 0,837 |
| OVCAR-8 | 0,020 | 1,565 | 1,634 | 1,571 | 1,587 | 1,630 | 1,570 |
| SK-OV-3 | 0,056 | 0,811 | 0,817 | 0,812 | 0,813 | 0,759 | 0,769 |
| Cáncer renal | | | | | | | |
| 786-0 | 0,073 | 1,715 | 1,716 | 1,715 | 1,726 | 1,731 | 1,686 |
| A498 | 0,087 | 1,058 | 0,996 | 0,877 | 0,737 | 0,692 | 0,716 |
| ACHN | 0,041 | 1,970 | 1,331 | 0,307 | 0,016 | 0,020 | 0,020 |
| CAKI-1 | 0,033 | 1,215 | 0,797 | 0,758 | 0,492 | 0,535 | 0,512 |
| RXF 393 | 0,101 | 0,973 | 0,496 | 0,086 | 0,043 | 0,029 | 0,028 |
| SN12C | 0,054 | 1,263 | 0,669 | 0,504 | 0,358 | 0,315 | 0,249 |
| TK-10 | 0,057 | 1,064 | 1,000 | 0,925 | 0,811 | 0,666 | 0,568 |
| UO-31 | 0,095 | 1,457 | 1,201 | 0,838 | 0,701 | 0,476 | 0,418 |

FIG. 21A-3

16E2 Octopus (anti-DR5) - 6 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | GI50 | TGI | LC50 |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | | | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | |
| SNB-19 | 88 | 88 | 85 | 99 | 100 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SNB-75 | 102 | 90 | 91 | 104 | 101 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| U251 | 11 | 10 | 7 | 10 | 9 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Melanoma | | | | | | | | | |
| LOX IMVI | 68 | 53 | 41 | 39 | 41 | 4,08E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| M14 | 62 | 39 | 33 | 31 | 34 | 1,83E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-MEL-2 | 30 | 19 | 20 | 16 | 17 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-MEL-28 | 52 | 49 | 44 | 38 | 34 | 2,11E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-MEL-5 | 101 | 103 | 100 | 102 | 101 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| UACC-257 | 56 | 49 | 45 | 42 | 40 | 2,64E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| UACC-62 | 67 | 55 | 45 | 43 | 47 | 5,44E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer de ovario | | | | | | | | | |
| IGROV1 | 94 | 102 | 104 | 98 | 96 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| OVCAR-3 | -55 | -52 | -55 | -53 | -62 | <1,00E+00 | <1,00E+00 | <1,00E+00 | |
| OVCAR-4 | 83 | 81 | 64 | 62 | 52 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| OVCAR-5 | 86 | 63 | 63 | 51 | 49 | 5,85E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| OVCAR-8 | 104 | 100 | 101 | 104 | 100 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SK-OV-3 | 101 | 100 | 100 | 93 | 94 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer renal | | | | | | | | | |
| 786-0 | 100 | 100 | 101 | 101 | 98 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| A498 | 94 | 81 | 67 | 62 | 65 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| ACHN | 67 | 14 | -61 | -51 | -51 | 1,44E+00 | 3,92E+00 | 8,46E+00 | |
| CAKI-1 | 65 | 61 | 39 | 42 | 41 | 5,66E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| RXF 393 | 45 | -15 | -58 | -71 | -72 | <1,00E+00 | 2,37E+00 | 8,08E+00 | |
| SN12C | 51 | 37 | 25 | 22 | 16 | 1,08E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| TK-10 | 94 | 86 | 75 | 60 | 51 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| UO-31 | 81 | 55 | 44 | 28 | 24 | 5,32E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |

FIG._21A-4

16E2 Octopus (anti-DR5) - 6 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | | | | | |
|---------------------|----------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | |
| Cáncer de próstata | | | | | | | | |
| PC-3 | 0,030 | 0,879 | 0,520 | 0,379 | 0,334 | 0,315 | 0,333 | |
| DU-145 | 0,057 | 1,962 | 1,887 | 1,790 | 1,717 | 1,662 | 1,654 | |
| Cáncer de mama | | | | | | | | |
| MCF7 | 0,060 | 2,908 | 2,856 | 2,870 | 2,865 | 2,833 | 2,843 | |
| NCI/ADR-RES | 0,045 | 1,087 | 1,064 | 1,054 | 1,157 | 1,130 | 1,088 | |
| MDA-MB-231/ATCC | 0,042 | 0,819 | 0,674 | 0,577 | 0,538 | 0,488 | 0,575 | |
| HS 578T | 0,055 | 0,759 | 0,470 | 0,322 | 0,261 | 0,260 | 0,201 | |
| MDA-MB-435 | 0,041 | 2,284 | 1,227 | 0,955 | 0,806 | 0,819 | 0,723 | |
| MDA-N | 0,010 | 0,861 | 0,490 | 0,457 | 0,355 | 0,322 | 0,313 | |
| BT-549 | 0,100 | 1,316 | 0,995 | 0,521 | 0,364 | 0,319 | 0,251 | |
| T-47D | 0,049 | 0,626 | 0,613 | 0,564 | 0,528 | 0,526 | 0,613 | |

FIG._21A-5

16E2 Octopus (anti-DR5) - 6 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | GI50 | TGI | LC50 |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | | | |
| Cáncer de próstata | | | | | | | | | |
| PC-3 | 58 | 41 | 36 | 34 | 36 | 1,70E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| DU-145 | 96 | 91 | 87 | 84 | 84 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer de mama | | | | | | | | | |
| MCF7 | 98 | 99 | 98 | 97 | 98 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| NCI/ADR-RES | 98 | 97 | 107 | 104 | 100 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-MB-231/ATCC | 81 | 69 | 64 | 57 | 69 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HS 578T | 59 | 38 | 29 | 29 | 21 | 1,64E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-MB-435 | 53 | 41 | 34 | 35 | 30 | 1,32E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-N | 56 | 53 | 40 | 37 | 36 | 4,04E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| BT-549 | 74 | 35 | 22 | 18 | 12 | 2,01E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| T-47D | 98 | 89 | 83 | 83 | 98 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |

FIG._21A-6

APO2L- 6 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 | | | | Densidades ópticas medias | | |
|--------------------------------|-------------|---------------------|--------|--------|-------|---------------------------|-------|--|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | |
| Leucemia | | | | | | | | |
| CCRF-CEM | 0,004 | 0,842 | 0,753 | 0,453 | 0,365 | 0,574 | 0,569 | |
| HL-60 (TB) | 0,068 | 2,822 | 0,712 | 0,317 | 0,202 | 0,116 | 0,080 | |
| K-562 | 0,046 | 2,792 | 2,962 | 3,017 | 2,920 | 2,716 | 2,626 | |
| MOLT-4 | 0,009 | 1,040 | 0,929 | 0,928 | 0,965 | 0,999 | 0,797 | |
| RPMI-8226 | 0,061 | 1,661 | 0,072 | 0,038 | 0,041 | 0,025 | 0,022 | |
| SR | 0,031 | 2,591 | 2,540 | 2,234 | 1,915 | 1,822 | 1,708 | |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 0,021 | 2,037 | 2,071 | 2,070 | 2,029 | 2,045 | 2,038 | |
| EKVX | 0,057 | 1,052 | 1,070 | 1,039 | 1,078 | 1,000 | 0,962 | |
| HOP-62 | 0,059 | 0,891 | 0,854 | 0,854 | 0,787 | 0,725 | 0,662 | |
| HOP-92 | 0,110 | 0,906 | 0,750 | 0,698 | 0,700 | 0,705 | 0,723 | |
| NCI-H23 | 0,103 | 1,184 | 1,180 | 1,147 | 1,122 | 1,185 | 1,163 | |
| NCI-H322M | 0,038 | 0,976 | 0,824 | 0,606 | 0,488 | 0,436 | 0,346 | |
| NCI-H460 | 0,050 | 2,857 | 0,536 | 0,239 | 0,153 | 0,063 | 0,048 | |
| NCI-H522 | 0,064 | 0,461 | 0,354 | 0,344 | 0,336 | 0,263 | 0,238 | |
| Cáncer de colon | | | | | | | | |
| COLO 205 | 0,001 | 1,396 | -0,005 | -0,007 | 0,006 | 0,002 | 0,014 | |
| HCC-2998 | 0,031 | 1,083 | 0,682 | 0,274 | 0,305 | 0,202 | 0,189 | |
| HCT-116 | 0,068 | 3,014 | 2,272 | 1,606 | 1,249 | 0,953 | 0,821 | |
| HCT-15 | 0,020 | 2,169 | 0,196 | 0,054 | 0,039 | 0,018 | 0,030 | |
| HT29 | 0,052 | 1,968 | 1,970 | 1,962 | 2,035 | 2,034 | 2,063 | |
| KM12 | 0,010 | 0,633 | 0,249 | 0,218 | 0,113 | 0,052 | 0,052 | |
| SW-620 | 0,010 | 2,236 | 1,477 | 1,220 | 1,040 | 0,943 | 0,608 | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | |
| SF-268 | 0,041 | 0,893 | 0,891 | 0,914 | 0,906 | 0,852 | 0,927 | |
| SF-295 | 0,054 | 1,659 | 1,054 | 0,706 | 0,634 | 0,557 | 0,529 | |
| SF-539 | 0,030 | 1,513 | 1,411 | 1,046 | 1,113 | 1,034 | 0,689 | |

FIG. 21B-1

APO2L - 6 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | GI50 | TGI | LC50 |
|--------------------------------|---------------------------|------|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | | | | |
| Leucemia | | | | | | | | | |
| CCRF-CEM | 89 | 54 | 43 | 68 | 67 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HL-60 (TB) | 23 | 9 | 5 | 2 | 0 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| K-562 | 106 | 108 | 105 | 97 | 94 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MOLT-4 | 89 | 89 | 93 | 96 | 76 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| RPMI-8226 | 1 | -39 | -34 | -59 | -65 | <1,00E+00 | 1,02E+00 | 2,10E+01 | |
| SR | 98 | 86 | 74 | 70 | 65 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer pulmonar no microcítico | | | | | | | | | |
| A549/ATCC | 102 | 102 | 100 | 100 | 100 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| EKVX | 102 | 99 | 103 | 95 | 91 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HOP-62 | 96 | 95 | 87 | 80 | 72 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HOP-92 | 80 | 74 | 74 | 75 | 77 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| NCI-H23 | 100 | 97 | 94 | 100 | 98 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| NCI-H322M | 84 | 60 | 48 | 42 | 33 | 8,30E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| NCI-H460 | 17 | 7 | 4 | 0 | -4 | <1,00E+00 | 3,57E+01 | >1,00E+02 | |
| NCI-H522 | 73 | 70 | 68 | 50 | 44 | 3,22E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer de colon | | | | | | | | | |
| COLO 205 | -100 | -100 | 0 | 0 | 1 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HCC-2998 | 62 | 23 | 26 | 16 | 15 | 1,43E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HCT-116 | 75 | 52 | 40 | 30 | 26 | 3,91E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HCT-15 | 8 | 2 | 1 | -10 | 0 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HT29 | 100 | 100 | 103 | 103 | 105 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| KM12 | 38 | 33 | 20 | 7 | 7 | <1,00E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SW-620 | 66 | 54 | 46 | 42 | 27 | 5,89E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | |
| SF-268 | 100 | 103 | 102 | 95 | 104 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SF-295 | 62 | 41 | 36 | 31 | 30 | 1,92E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| SF-539 | 93 | 68 | 73 | 68 | 44 | 7,59E+01 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |

FIG._21B-2

| Panel/Línea celular | | APO2L - 6 Días | | | | |
|-------------------------|-------|---------------------|-------|----------------------------------|-------|-------|
| | | Concentración Log10 | | | | |
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 |
| Tiempo Cero | | | | Densidades ópticas medias | | |
| 0,016 | 1,579 | 1,639 | 1,558 | 1,586 | 1,650 | 1,563 |
| 0,063 | 0,524 | 0,484 | 0,529 | 0,497 | 0,531 | 0,531 |
| 0,012 | 1,537 | 0,360 | 0,314 | 0,358 | 0,332 | 0,353 |
| Melanoma | | | | | | |
| 0,037 | 3,184 | 2,701 | 2,366 | 2,418 | 2,050 | 2,276 |
| 0,035 | 1,827 | 1,721 | 1,740 | 1,634 | 1,636 | 1,551 |
| 0,083 | 0,504 | 0,366 | 0,344 | 0,393 | 0,383 | 0,391 |
| 0,045 | 1,350 | 1,130 | 1,163 | 1,105 | 1,015 | 0,843 |
| 0,095 | 1,718 | 1,748 | 1,792 | 1,711 | 1,824 | 2,003 |
| 0,070 | 0,830 | 0,756 | 0,716 | 0,744 | 0,692 | 0,664 |
| 0,121 | 1,729 | 1,649 | 1,630 | 1,410 | 1,396 | 1,459 |
| Cáncer de ovario | | | | | | |
| 0,018 | 1,901 | 1,898 | 1,794 | 1,820 | 1,801 | 1,734 |
| 0,086 | 1,293 | 0,097 | 0,073 | 0,049 | 0,032 | 0,037 |
| 0,071 | 1,553 | 1,364 | 1,289 | 1,245 | 1,060 | 1,102 |
| 0,101 | 1,436 | 1,357 | 1,269 | 1,246 | 1,206 | 1,149 |
| 0,020 | 1,641 | 1,540 | 1,606 | 1,595 | 1,634 | 1,608 |
| 0,056 | 0,848 | 0,834 | 0,807 | 0,853 | 0,821 | 0,834 |
| Cáncer renal | | | | | | |
| 0,073 | 1,816 | 1,818 | 1,830 | 1,853 | 1,816 | 1,834 |
| 0,087 | 1,108 | 1,080 | 1,046 | 1,034 | 0,988 | 0,969 |
| 0,041 | 2,105 | 2,060 | 2,051 | 1,993 | 1,958 | 1,867 |
| 0,033 | 1,080 | 1,108 | 0,941 | 1,017 | 1,031 | 0,959 |
| 0,101 | 0,982 | 0,589 | 0,322 | 0,362 | 0,450 | 0,262 |
| 0,054 | 1,352 | 1,354 | 1,353 | 1,319 | 1,346 | 1,257 |
| 0,057 | 1,226 | 1,159 | 1,058 | 1,042 | 0,939 | 0,802 |
| 0,095 | 1,523 | 1,434 | 1,395 | 1,377 | 1,343 | 1,340 |

FIG._21B-3

APO2L - 6 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|-----------|-----------|-----------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | 2,0 | | | GI50 | | | TGI | | | LC50 | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | GI50 | TGI | LC50 | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | GI50 | TGI | LC50 |
| Cáncer del SNC | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SNB-19 | 104 | 99 | 100 | 105 | 99 | >1,00E+02 | 99 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SNB-75 | 91 | 101 | 94 | 102 | 102 | >1,00E+02 | 102 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| U251 | 23 | 20 | 23 | 21 | 22 | <1,00E+00 | 22 | <1,00E+00 | <1,00E+00 | <1,00E+00 |
| Melanoma | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LOX IMVI | 85 | 74 | 76 | 64 | 71 | >1,00E+02 | 71 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| M14 | 94 | 95 | 89 | 89 | 85 | >1,00E+02 | 85 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SK-MEL-2 | 67 | 62 | 73 | 71 | 73 | >1,00E+02 | 73 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SK-MEL-28 | 83 | 86 | 81 | 74 | 61 | >1,00E+02 | 61 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SK-MEL-5 | 102 | 105 | 100 | 107 | 118 | >1,00E+02 | 118 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| UACC-257 | 90 | 85 | 89 | 82 | 78 | >1,00E+02 | 78 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| UACC-62 | 95 | 94 | 80 | 79 | 83 | >1,00E+02 | 83 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer de ovario | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IGROV1 | 100 | 94 | 96 | 95 | 91 | >1,00E+02 | 91 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| OVCAR-3 | 1 | -16 | -43 | -63 | -57 | <1,00E+00 | -57 | 1,07E+00 | 1,50E+01 | 1,50E+01 |
| OVCAR-4 | 87 | 82 | 79 | 67 | 70 | >1,00E+02 | 70 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| OVCAR-5 | 94 | 87 | 86 | 83 | 78 | >1,00E+02 | 78 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| OVCAR-8 | 94 | 98 | 97 | 100 | 98 | >1,00E+02 | 98 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| SK-OV-3 | 98 | 95 | 101 | 97 | 98 | >1,00E+02 | 98 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| Cáncer renal | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 786-0 | 100 | 101 | 102 | 100 | 101 | >1,00E+02 | 101 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| A498 | 97 | 94 | 93 | 88 | 86 | >1,00E+02 | 86 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| ACHN | 98 | 97 | 95 | 93 | 88 | >1,00E+02 | 88 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| CAKI-1 | 103 | 87 | 94 | 95 | 88 | >1,00E+02 | 88 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| RXF 393 | 55 | 25 | 30 | 40 | 18 | 1,23E+00 | 18 | 1,23E+00 | 1,23E+00 | 1,23E+00 |
| SN12C | 100 | 100 | 97 | 100 | 93 | >1,00E+02 | 93 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| TK-10 | 94 | 86 | 84 | 75 | 64 | >1,00E+02 | 64 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |
| UO-31 | 94 | 91 | 90 | 87 | 87 | >1,00E+02 | 87 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 |

FIG._21B-4

APO2L- 6 Días

| Panel/Línea celular | Tiempo Cero | Concentración Log10 Densidades ópticas medias | | | | |
|---------------------|-------------|---|-------|-------|-------|-------|
| | | Ctrl | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 |
| Cáncer de próstata | | | | | | |
| PC-3 | 0,030 | 0,817 | 0,520 | 0,467 | 0,384 | 0,342 |
| DU-145 | 0,057 | 1,911 | 1,810 | 1,744 | 1,693 | 1,024 |
| Cáncer de mama | | | | | | |
| MCF7 | 0,060 | 3,104 | 2,284 | 2,012 | 1,444 | 0,770 |
| NCI/ADR-RES | 0,045 | 1,013 | 1,037 | 1,036 | 1,017 | 0,974 |
| MDA-MB-231/ATCC | 0,042 | 0,873 | 0,774 | 0,755 | 0,805 | 0,720 |
| HS 578T | 0,055 | 0,491 | 0,512 | 0,511 | 0,508 | 0,515 |
| MDA-MB-435 | 0,041 | 2,083 | 2,007 | 1,758 | 1,719 | 1,387 |
| MDA-N | 0,010 | 0,984 | 0,809 | 0,738 | 0,803 | 0,571 |
| BT-549 | 0,100 | 1,296 | 1,457 | 1,398 | 1,377 | 1,346 |
| T-47D | 0,049 | 0,567 | 0,582 | 0,568 | 0,595 | 0,490 |

FIG._21B-5

APO2L- 6 Días

| Panel/Línea celular | Concentración Log10 | | | | | | GI50 | TGI | LC50 |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|-----------|------|
| | Porcentaje de crecimiento | | | | | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | GI50 | TGI | LC50 | |
| Cáncer de próstata | | | | | | | | | |
| PC-3 | 62 | 56 | 45 | 50 | 40 | | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| DU-145 | 95 | 91 | 88 | 70 | 52 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| Cáncer de mama | | | | | | | | | |
| MCF7 | 73 | 64 | 45 | 25 | 23 | 7,57E+00 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| NCI/ADR-RES | 102 | 102 | 100 | 99 | 96 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-MB-231/ATCC | 88 | 86 | 92 | 85 | 82 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| HS 578T | 105 | 105 | 104 | 106 | 106 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-MB-435 | 96 | 84 | 82 | 72 | 66 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| MDA-N | 82 | 75 | 81 | 68 | 58 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| BT-549 | 113 | 109 | 107 | 111 | 104 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |
| T-47D | 103 | 100 | 105 | 100 | 85 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | >1,00E+02 | |

FIG._21B-6

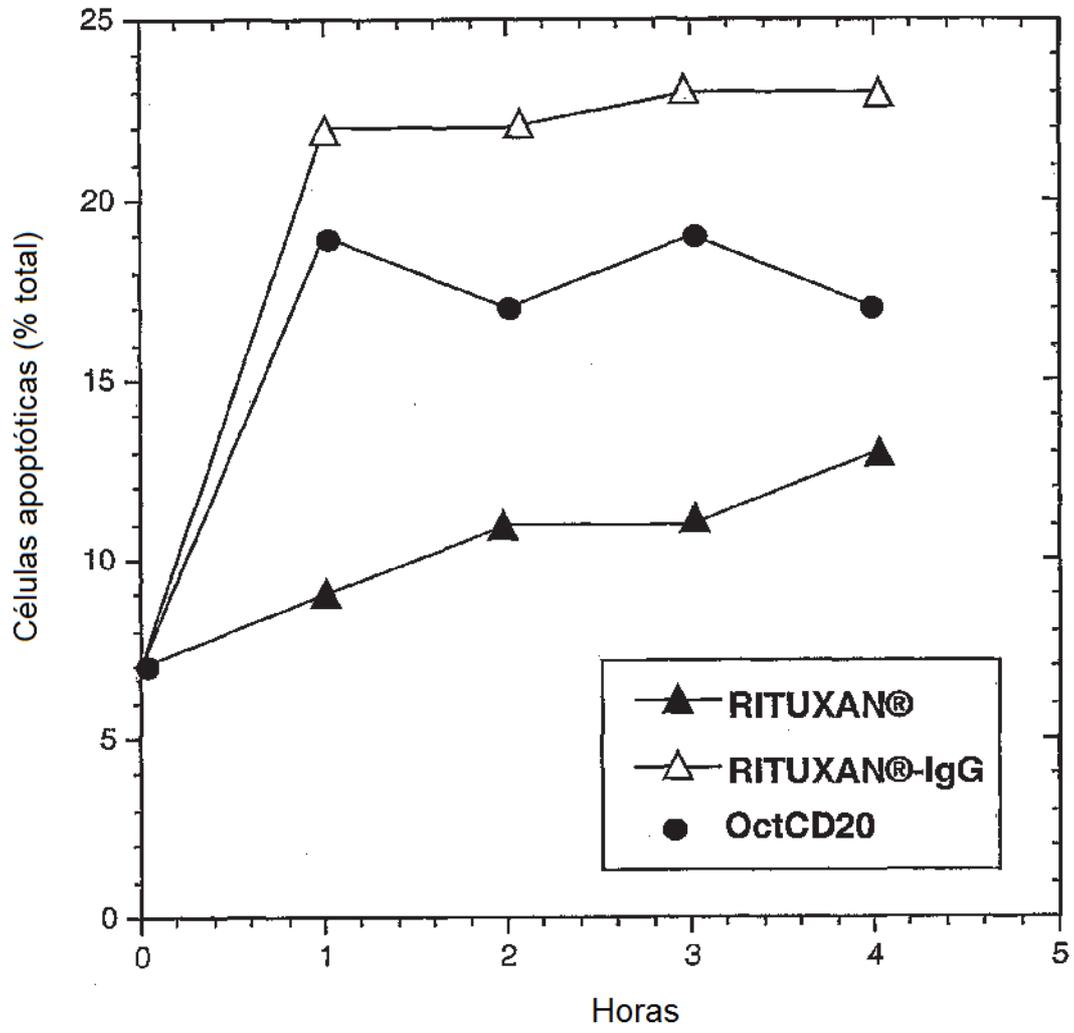
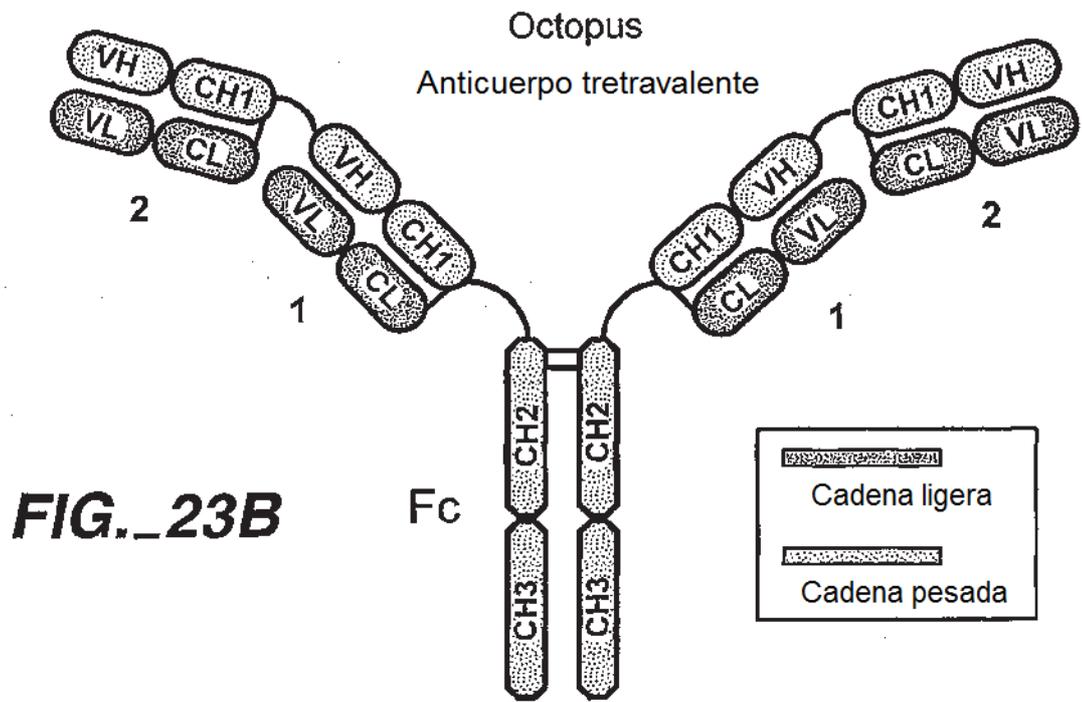
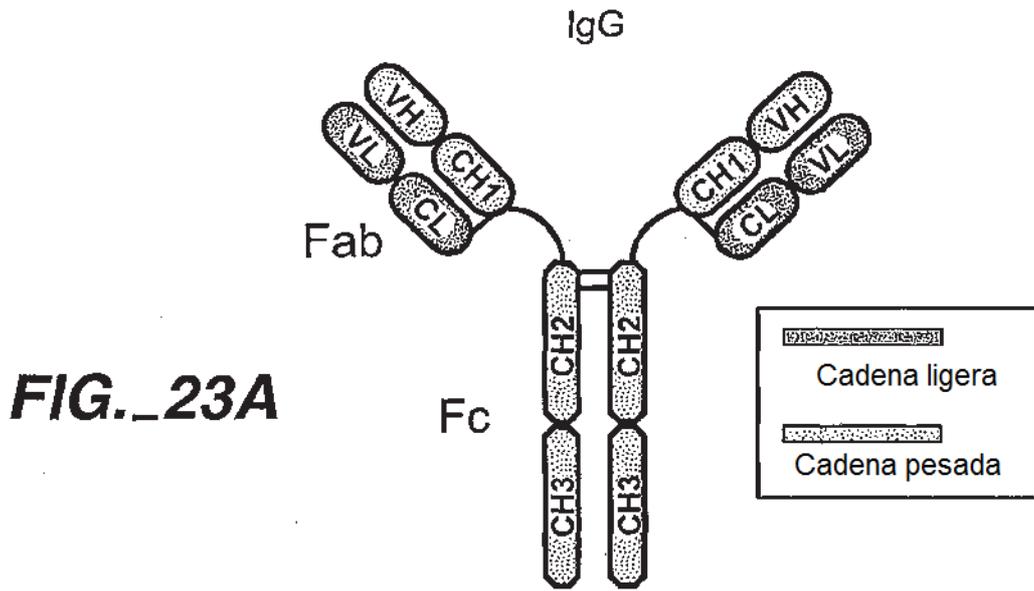
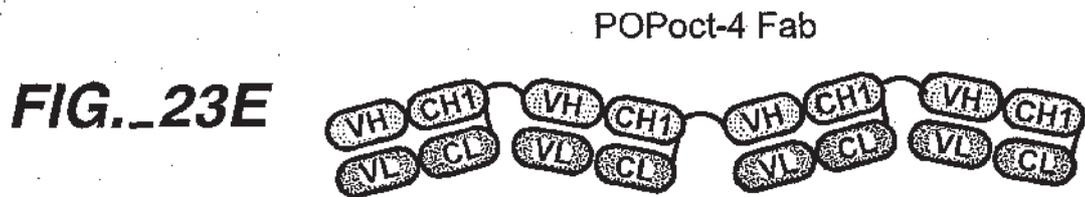
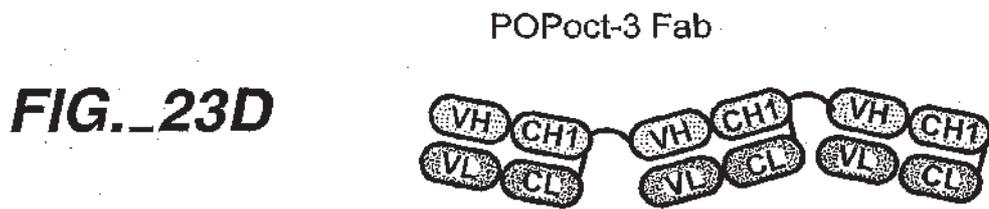
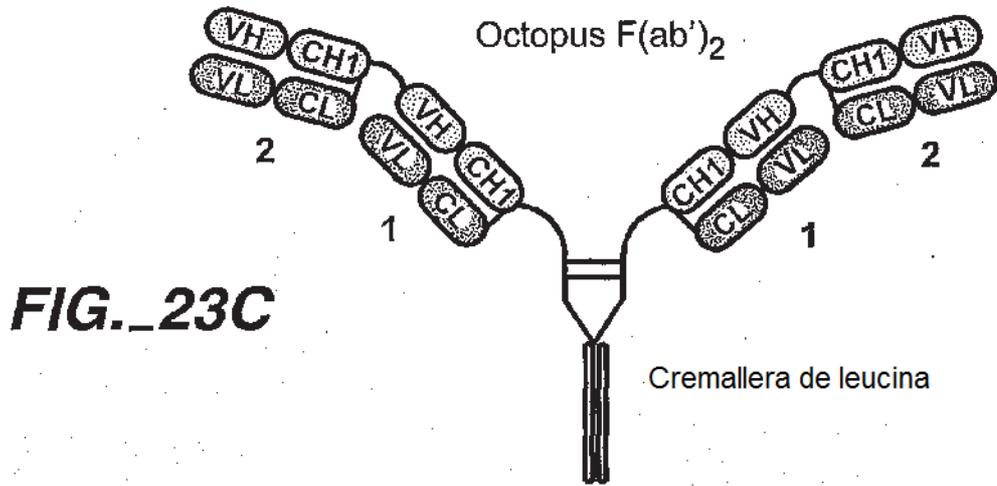
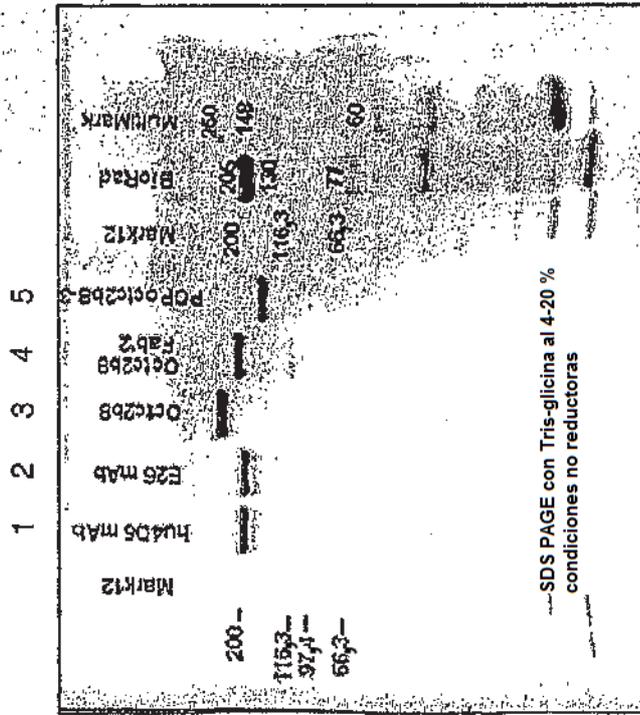


FIG._22





Comparación de tamaño de construcciones de Octopus:

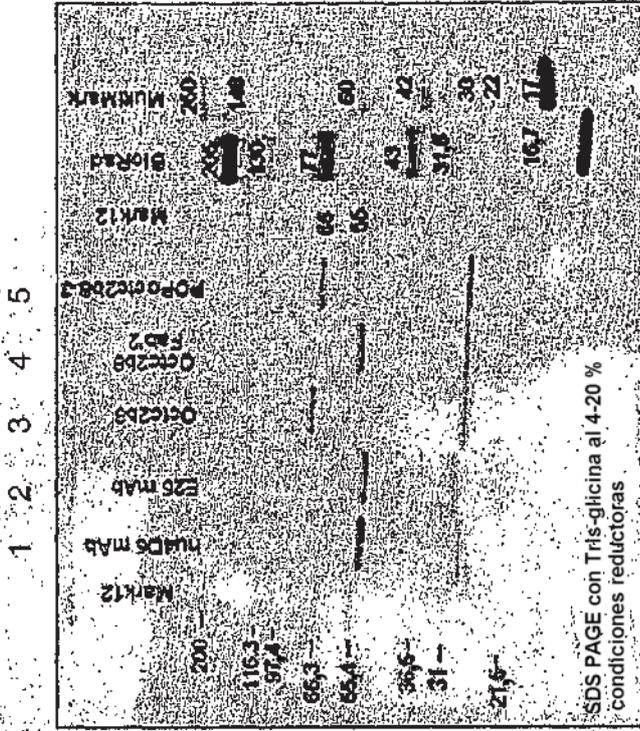


Condiciones no reductoras
PM de cadena pesada + ligera

| | |
|---------------|---------|
| mAb | 150 kDa |
| OctC2B8 | 240 kDa |
| OctC2B8 Fab'2 | 200 kDa |
| POPoctC2B8-3 | 140 kDa |
| POPoct-4 | 190 kDa |

FIG.-23F

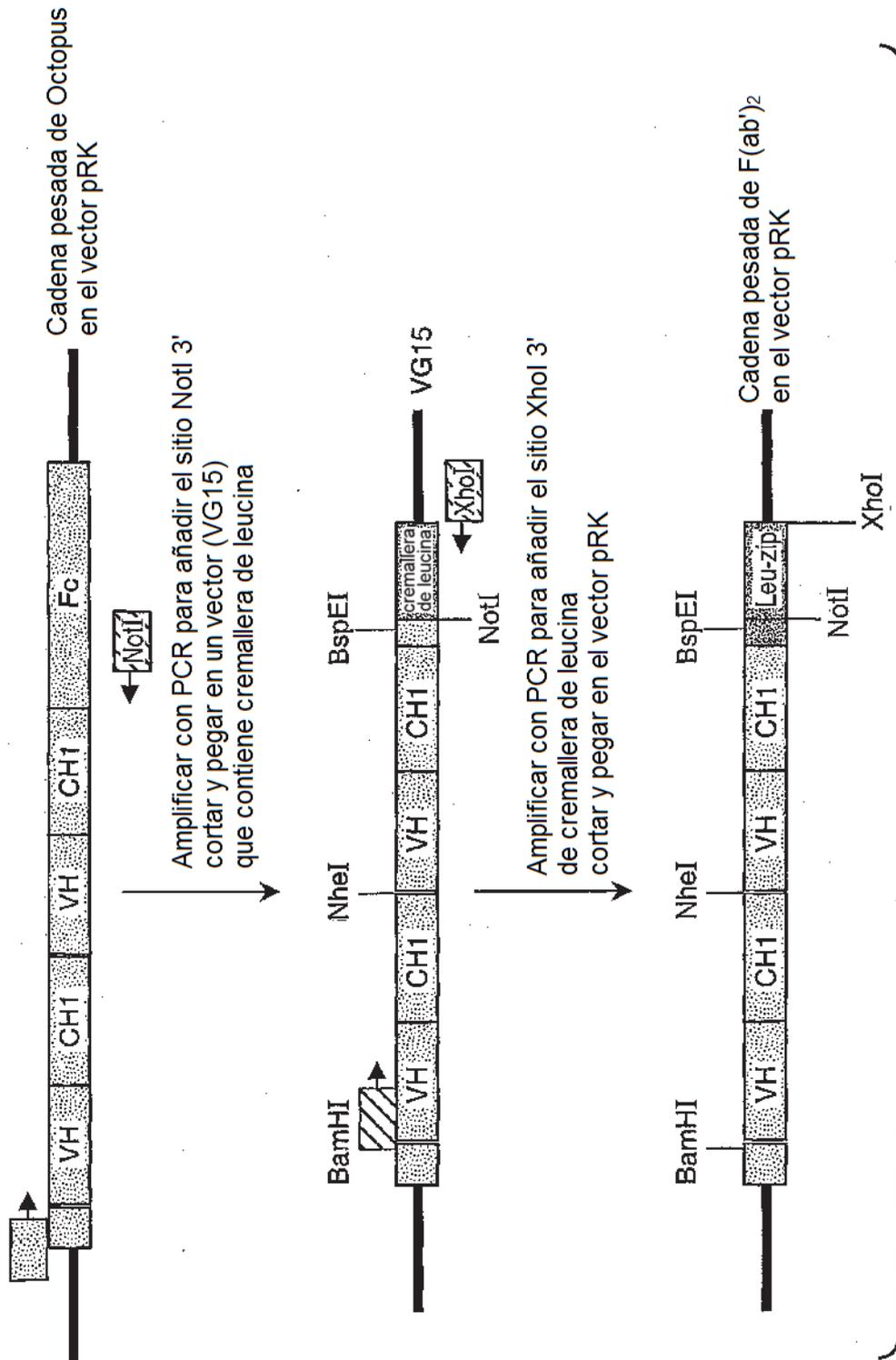
Comparación de tamaño de construcciones de Octopus:



Condiciones reductoras
PM de cadena pesada

| | |
|---------------|--------|
| mAb | 55 kDa |
| OctC2B8 | 75 kDa |
| OctC2B8 Fab'2 | 55 kDa |
| POPoctC2B8-3 | 73 kDa |
| POPoct-4 | 97 kDa |

FIG.-23G



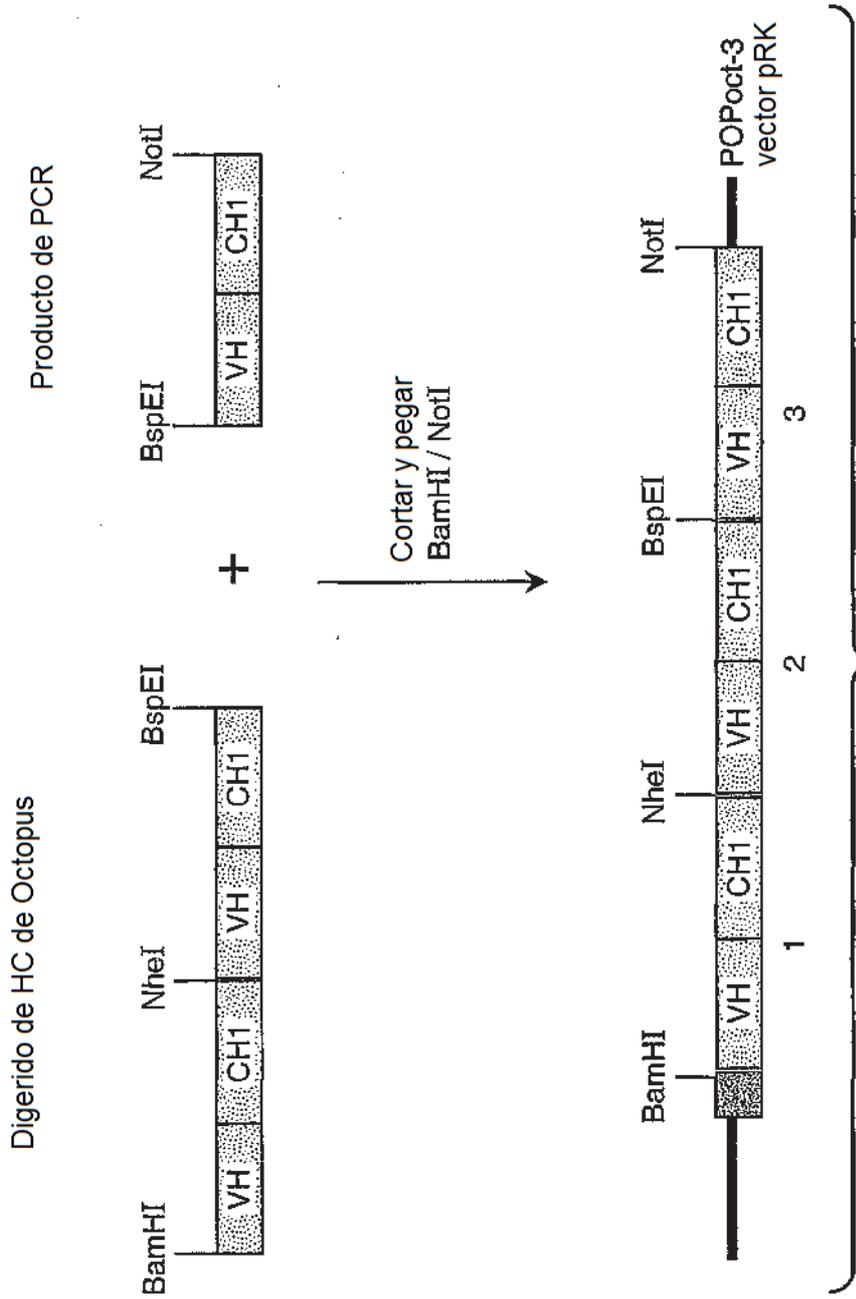


FIG. 25

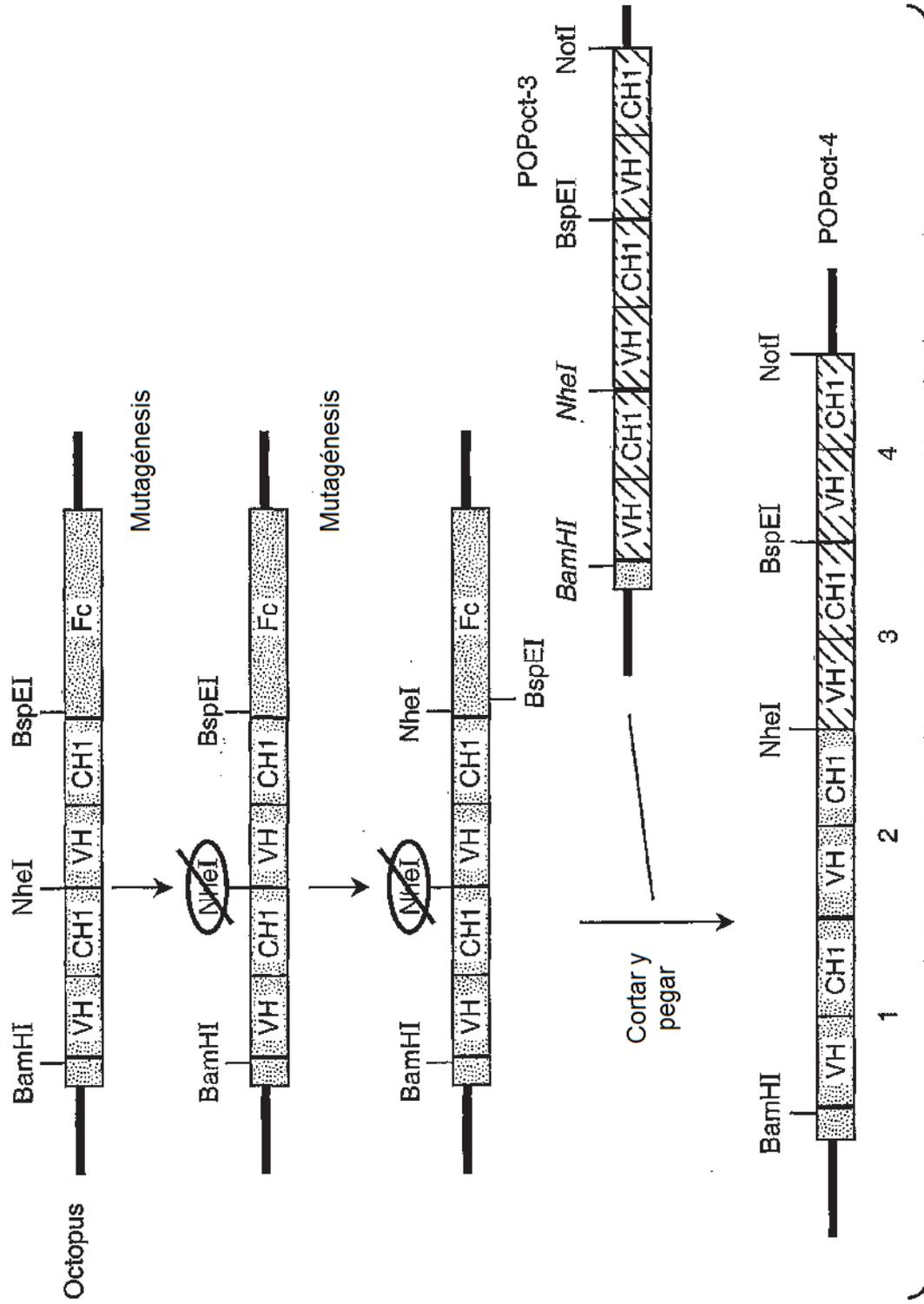
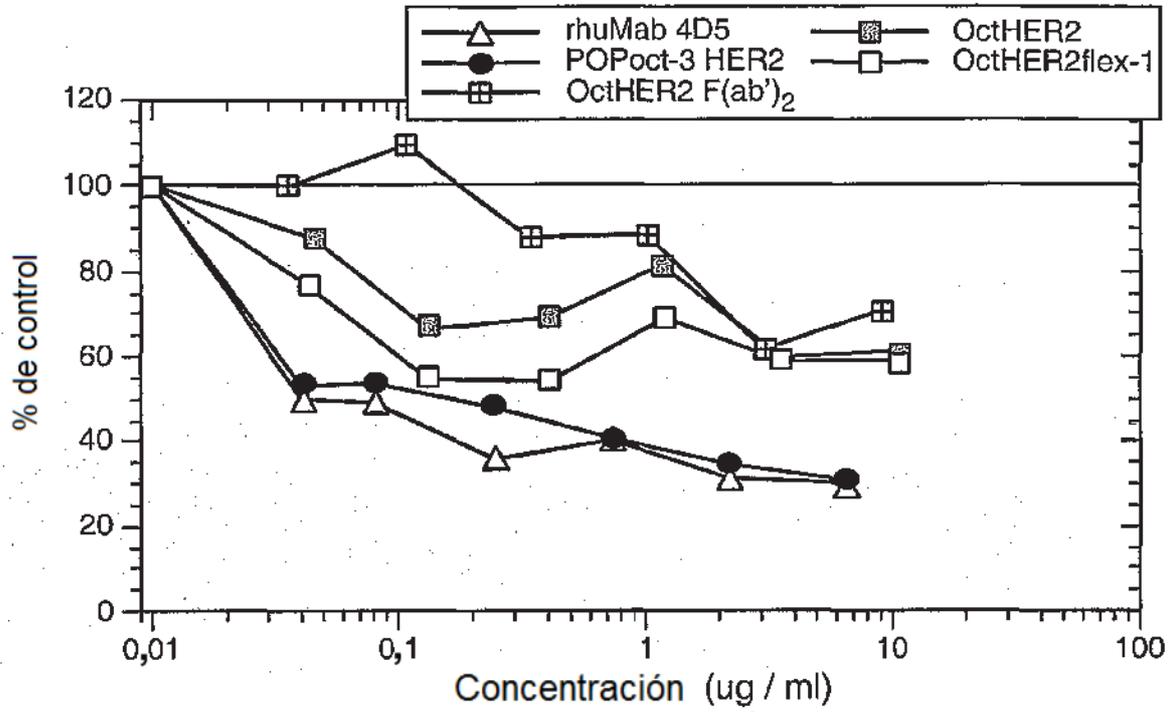


FIG._26



Gráfica representativa de n = 6 ensayos de citóstasis; cristal violeta

FIG._27

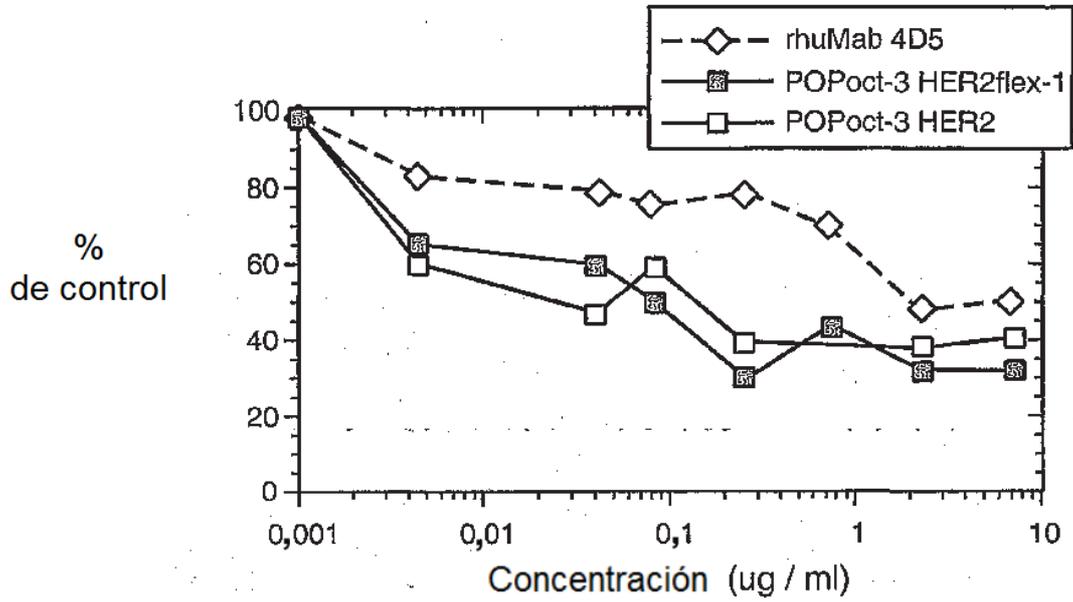


FIG._28A

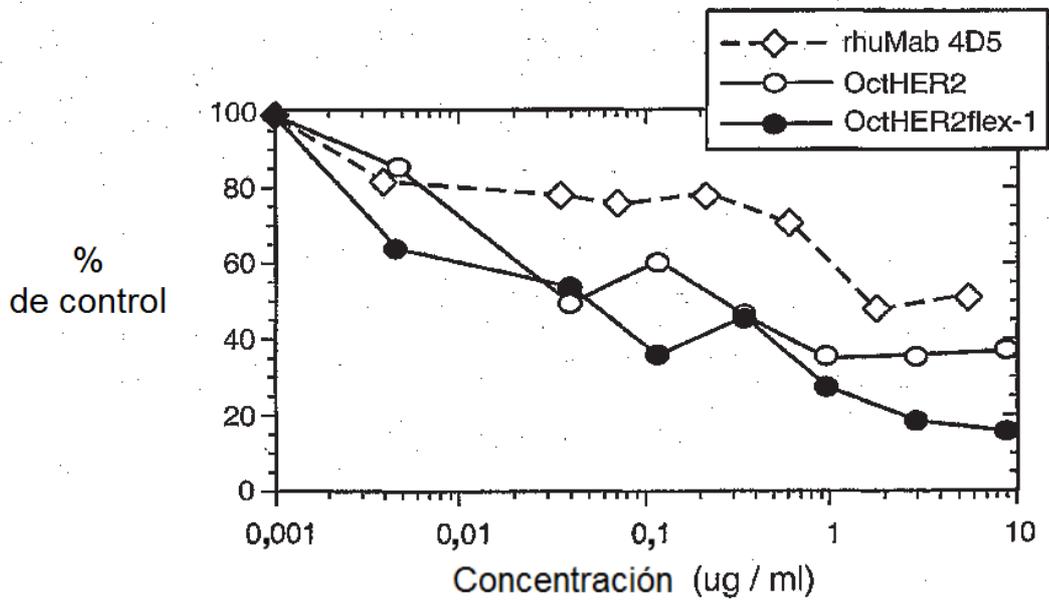


FIG._28B

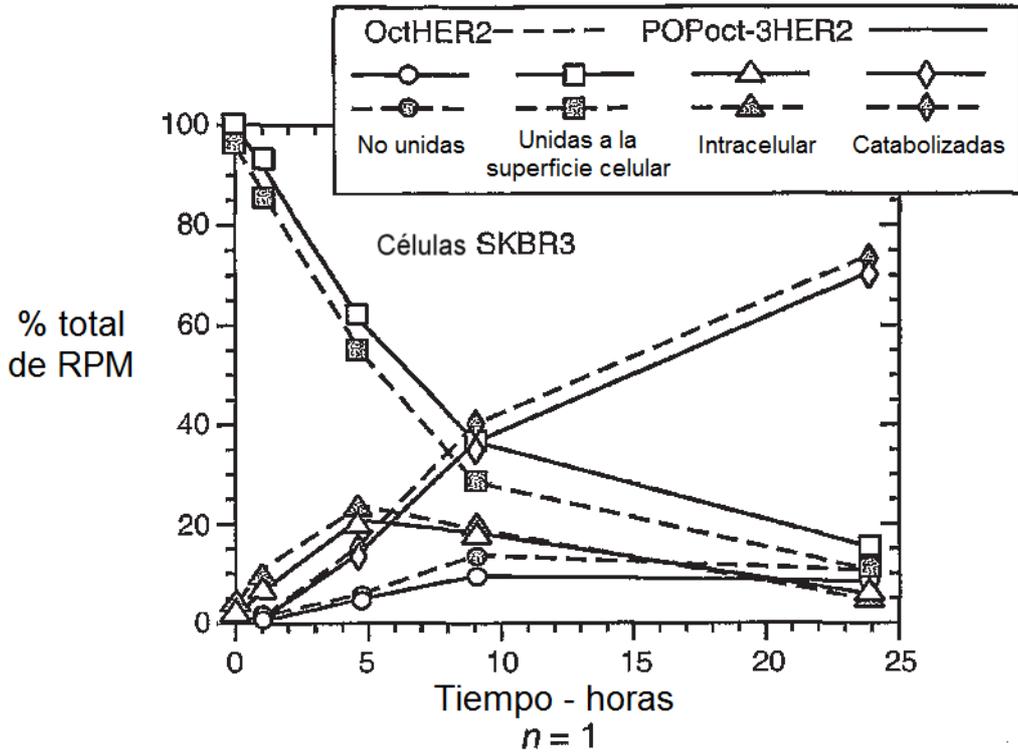


FIG. 29A

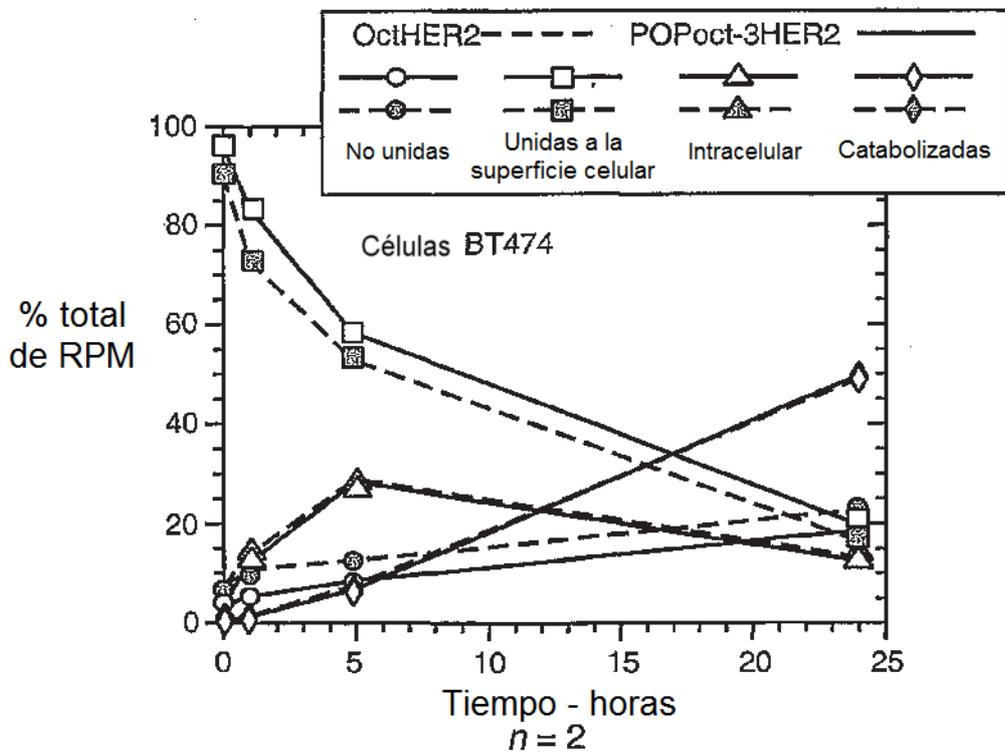


FIG. 29B

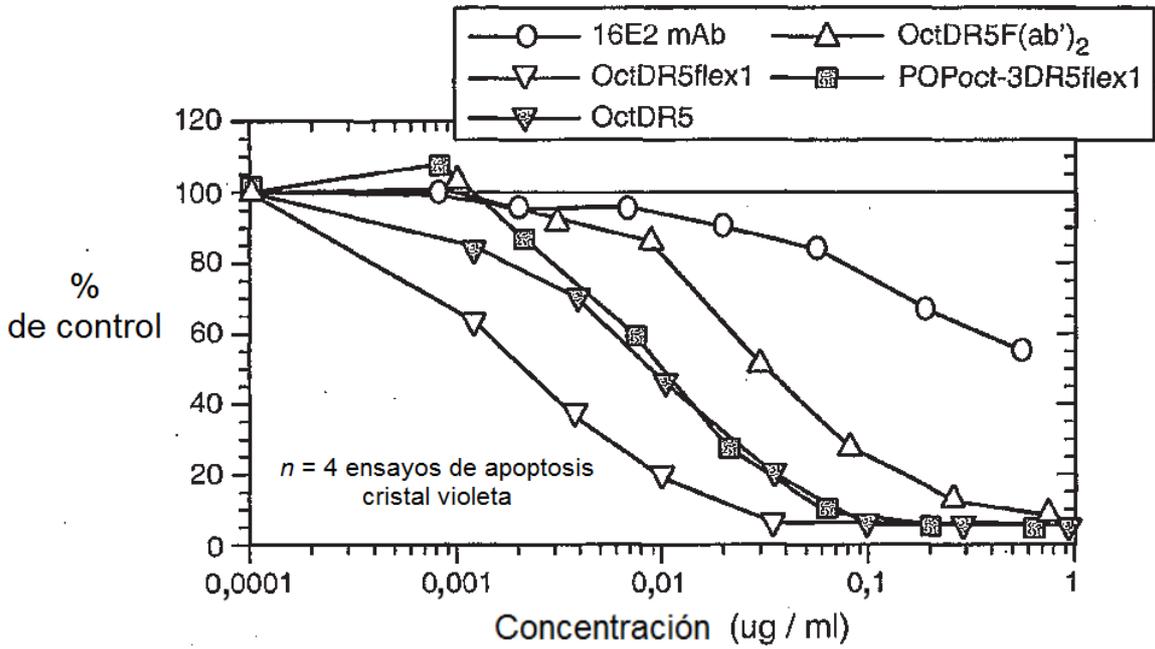


FIG. 30A

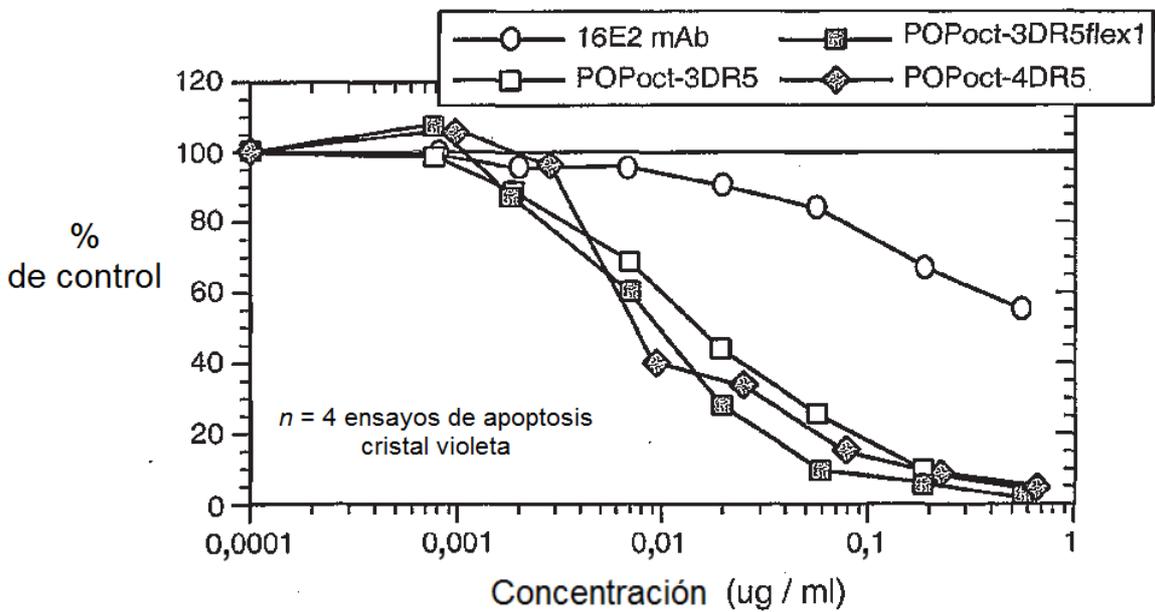


FIG. 30B

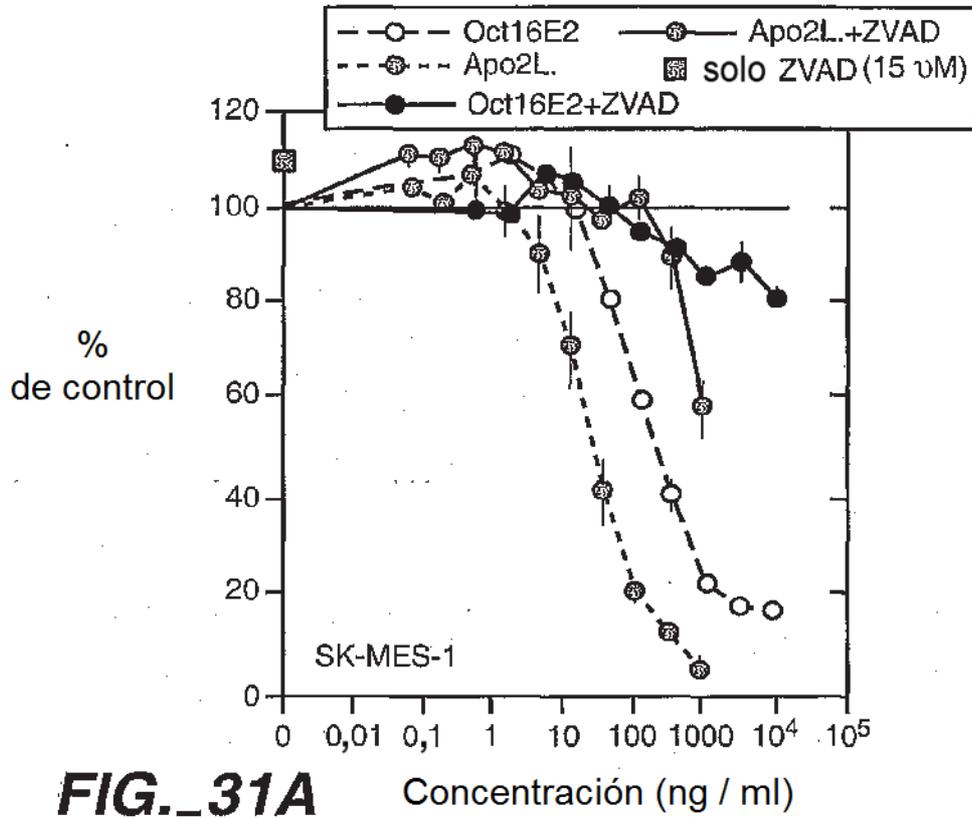


FIG. 31A

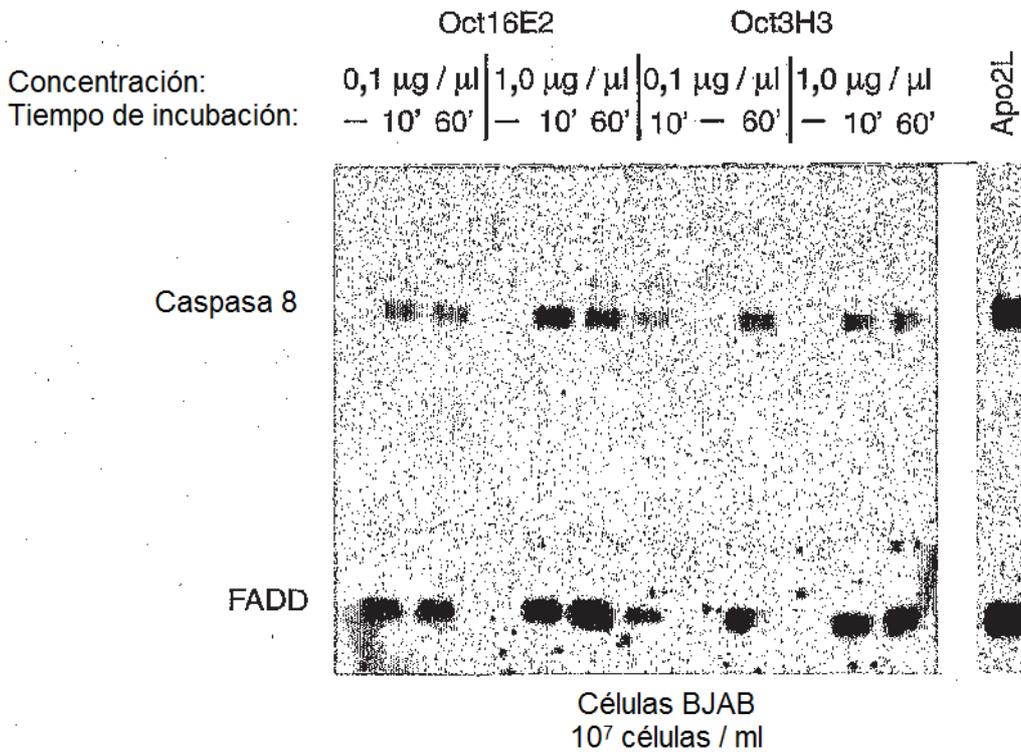


FIG. 31B

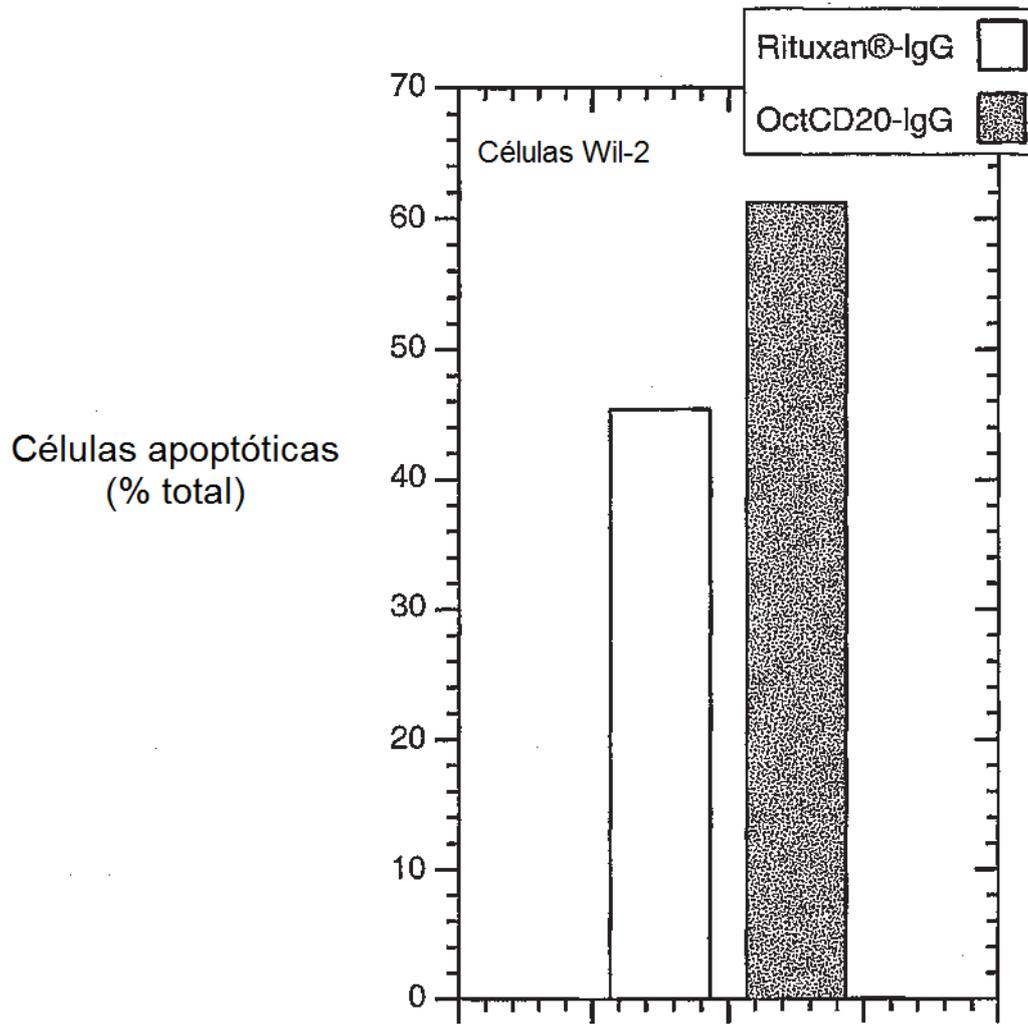


FIG. 32

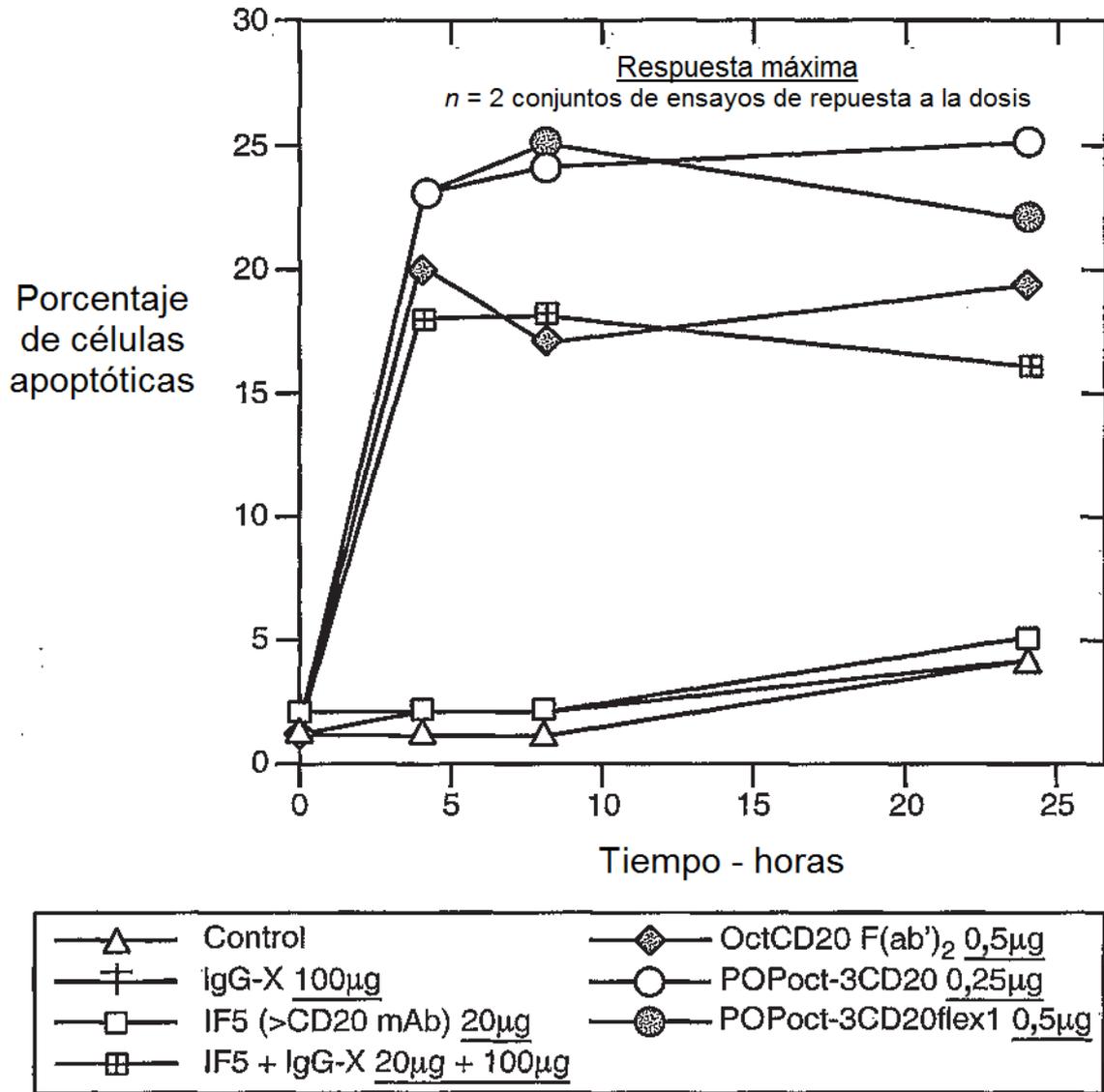


FIG. 33

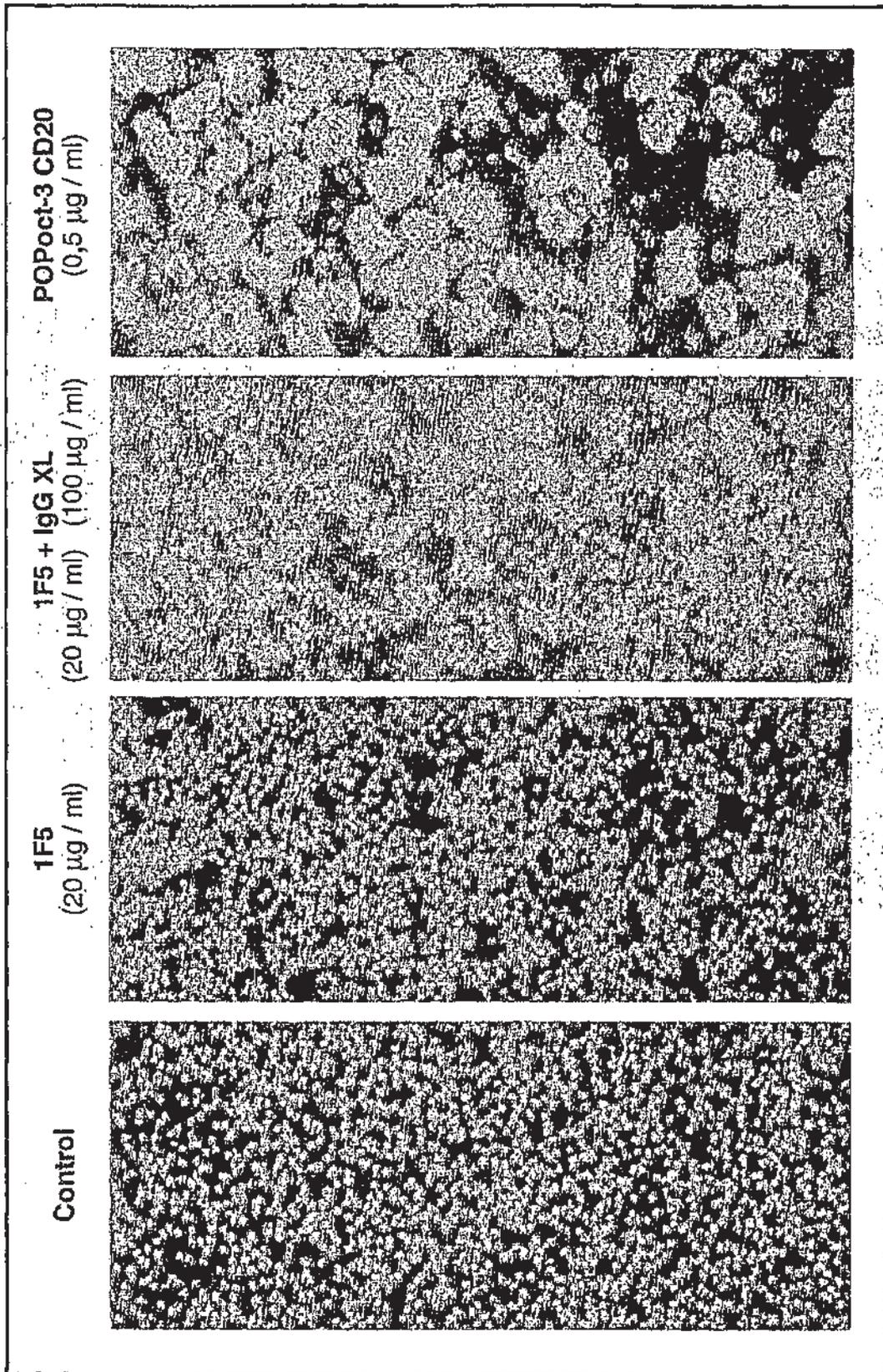


FIG. 34

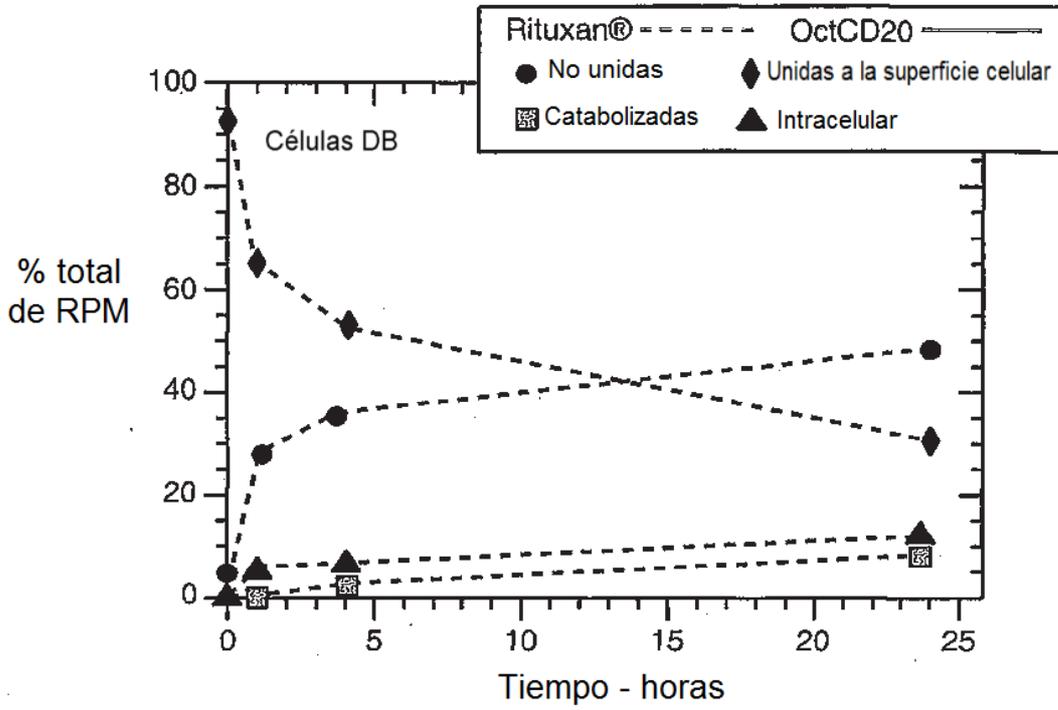


FIG. 35A

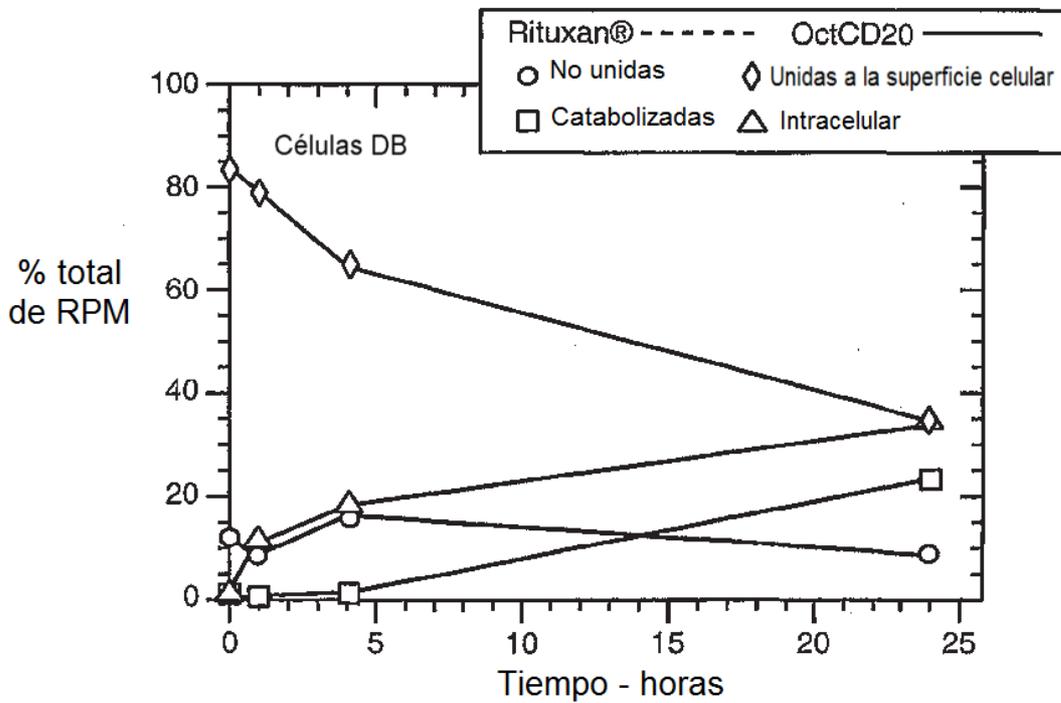


FIG. 35B

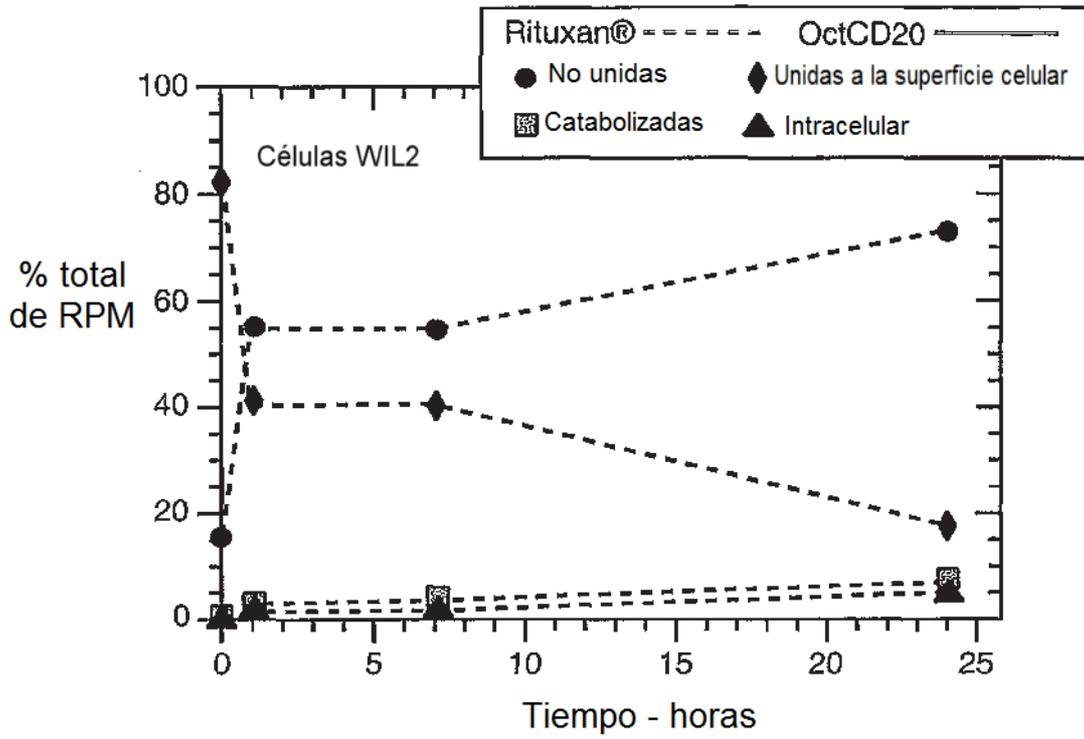


FIG. 35C

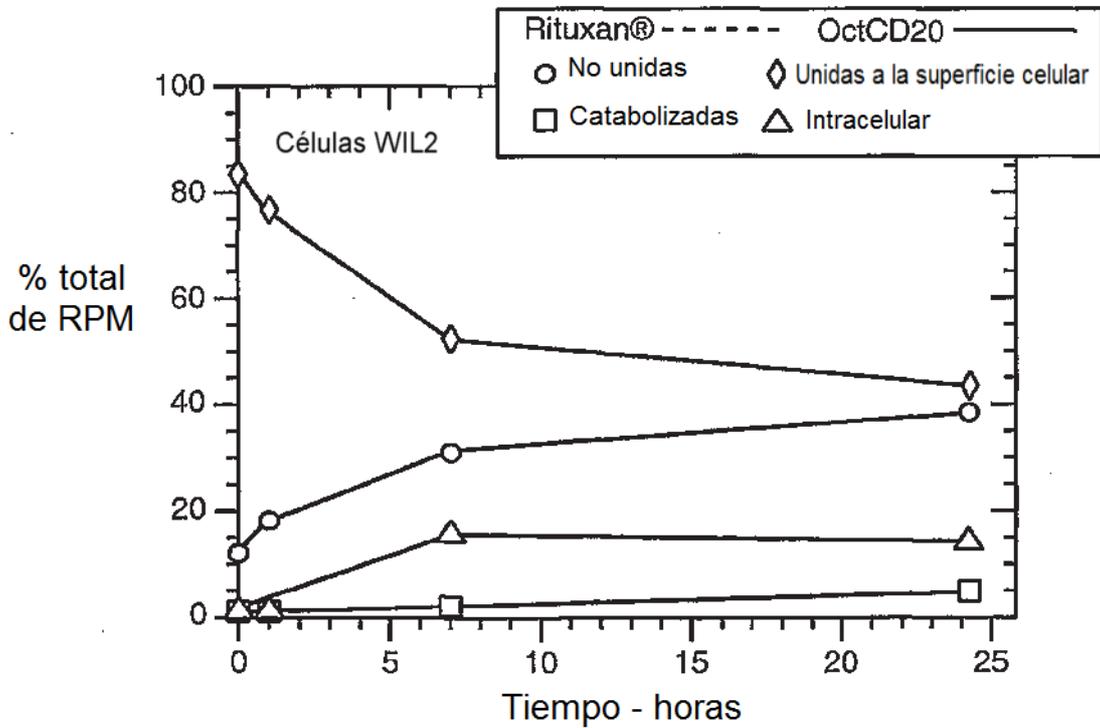


FIG. 35D

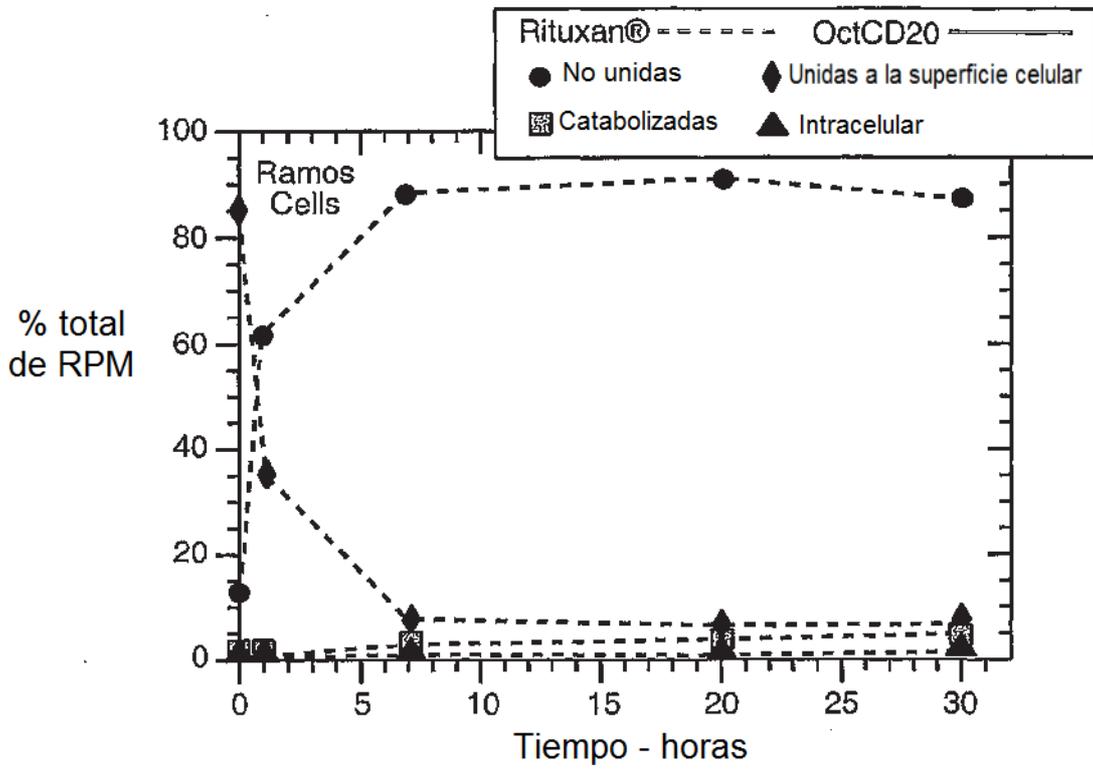


FIG. 35E

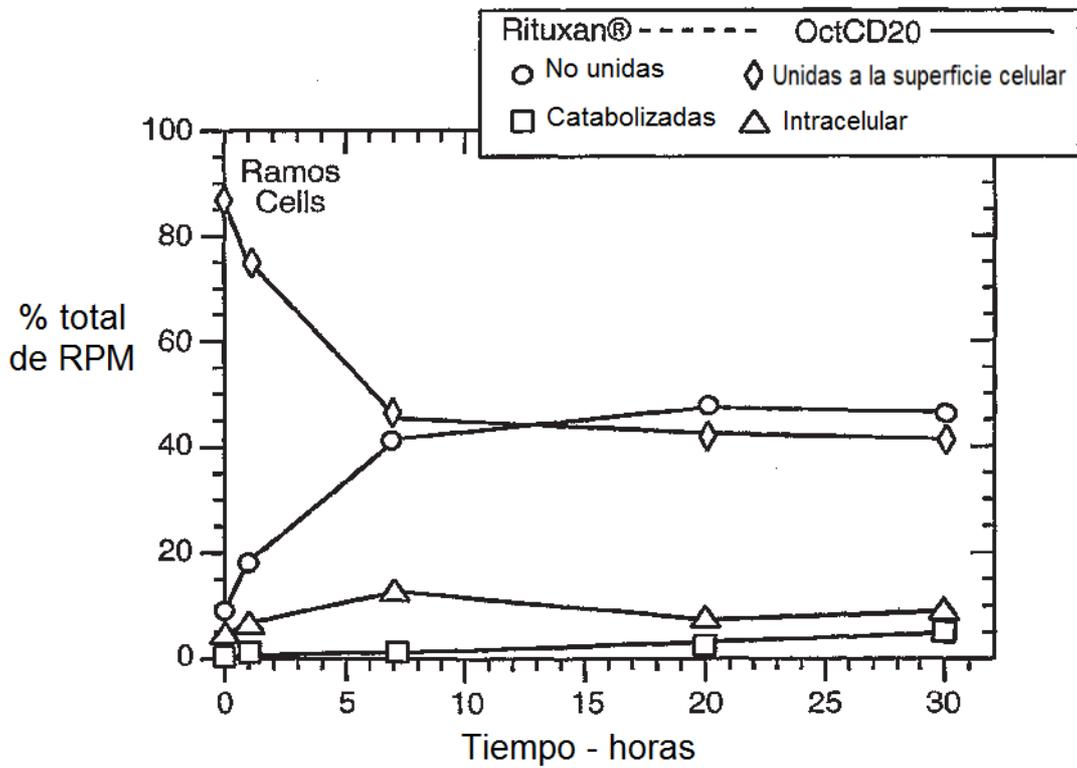


FIG. 35F